

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**



**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL  
RECEPTOR DE NEUROTROFINAS TRKB.  
MECANISMOS MOLECULARES E IMPLICACIONES  
BIOLÓGICAS.**

**TESIS DOCTORAL**

**RUBÉN DEOGRACIAS PASTOR**

**Madrid, 2007**



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

# **Regulación de la expresión del receptor de neurotrofinas TrkB en células nerviosas.**

**Mecanismos moleculares e implicaciones biológicas**

TESIS DOCTORAL

RUBÉN DEOGRACIAS PASTOR

LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA

Directoras

DRA. ÁNGELES RODRÍGUEZ PEÑA  
DRA. TERESA IGLESIAS VACAS  
DRA. MARGARITA DÍAZ-GUERRA GONZÁLEZ

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”  
CSIC – UAM

*A mi familia*

"El cerebro es un órgano blandengue, caliente, de contextura parecida a los excrementos. Es imposible que sea el sustrato de una función tan noble como es el pensamiento humano, por tanto el corazón debe estar a cargo de esa función"

Aristóteles.

Historia de los animales.



## **Agradecimientos**

A las Dras. Ángeles Rodríguez Peña, Teresa Iglesias y Margarita Díaz-Guerra, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral, por sus continuos esfuerzos para que esta tesis viese la luz y por compartir conmigo la visión de lo que es la ciencia.

A mis compañeros, y sin embargo amigos, del IIB tanto del 2.7 como del 2.4.1 y 2.4.2, por haberme ayudado desinteresadamente en todo momento, incluso en las horas de las comidas y los cafés: Sergio, Mónica, Jesús, Irene, Lorena, Josué, María y Roberto. A todos los compañeros que siempre se ofrecieron a ayudarme de manera tan espontánea: Gemma, Eva, Oscar, Lucía, Celia, Alonso y Noemí. A los que una vez estuvieron por aquí “dando la lata” y que me aportaron lo mejor de su forma de ser, su amistad y sus conocimientos: Ali, Mari Carmen, Elena, Laura, Laurita, Juan Carlos, Oscar Aguilera y por supuesto Érika, que tanto me ha ayudado.

Al Prof. Yves Barde por acogerme durante dos meses en su laboratorio y darme la oportunidad de tener una visión mucho más amplia de lo que supone la Neurociencia, demostrándome que el conocimiento te lleva irremediabilmente al desconocimiento. A la gente del Biozentrum, que de manera tan generosa me tendieron la mano y me convirtieron tanto en su compañero como en su amigo: Nico, Steffi, Vassiliki, Melanie, Tomoya, Ulrike, Valérie, Lixin y Christine.

Indudablemente a Jny Wittker, por su ayuda administrativa durante mi breve etapa en el Biozentrum.

A toda la gente de los diferentes departamentos del IIB por hacernos nuestro trabajo más fácil: Cocina de Medios, Cultivo Celular, Almacén, Animalario, Informática, Imagen Científica, Administración, Recepción, Mantenimiento, Biblioteca, Protección Radiológica y Secuenciación.

A mis amigos, que a pesar de no tener ni idea de ciencia han sabido aguantar mis charlas durante todos estos años. Gracias por no llamar a los de la camisa blanca.

A mis Padres y hermanos, porque sin duda alguna sin ellos jamás hubiera podido ser lo que soy.

A Elena, porque sin ella para mí la ciencia no sería igual y en especial a mi hijo Alejandro, que me está demostrando que lo más hermoso de esta vida no está en el futuro, sino en el presente.

## Resumen.

TrkB, receptor de las neurotrofinas BDNF y NT-4/5, media la supervivencia de poblaciones específicas de neuronas durante el desarrollo, y en estado adulto participa en respuestas adaptativas y situaciones patológicas. El ARNm de TrkB codifica para varias isoformas, una completa con un dominio tirosina kinasa (TrkB-FI) y otras truncadas (TrkB-T1, TrkB-T2 y TrkB-T-Shc) carentes de actividad catalítica. En el presente estudio demostramos que en astrocitos, la activación del factor de transcripción CREB de forma dependiente de las vías de señalización AMPc/PKA y ATP/CaMK, incrementa la expresión de TrkB-T1. En neuronas corticales la activación de CREB dependiente de AMPc/PKA aumenta la expresión de las isoformas TrkB-FI y TrkB-T1. En ambos tipos celulares, esta activación es debida a dos secuencias CRE localizadas en el promotor P2 del gen *trkB*. Estos resultados aportan las bases moleculares que explican como se produce el incremento de la expresión de TrkB en respuesta a diferentes respuestas adaptativas en las que CREB está involucrado. Por otro lado, demostramos que la estimulación excitotóxica de los receptores de glutamato tipo NMDA cambia el patrón de expresión de las isoformas de TrkB en neuronas corticales, aumentando TrkB-T1 y disminuyendo TrkB-FI, y que existe una relación directa entre la muerte neuronal y dicho cambio de expresión. Así, la sobre-expresión de TrkB-FI reduce la muerte dependiente de NMDA, mientras que la sobre-expresión de TrkB-T1 la aumenta. De acuerdo con estos resultados, en isquemia (un modelo de excitotoxicidad *in vivo*) se produce un aumento de la expresión del receptor truncado, sugiriendo que el cambio de expresión de la isoformas de TrkB está

involucrado en los procesos de muerte celular en condiciones de excitotoxicidad.

## Abstract.

TrkB as the receptor for the neurotrophins BDNF and NT-4/5 mediates the survival of specific neuronal populations during development, and in adulthood participates in adaptative responses and pathological conditions. *trkB* gene encodes a full length isoform with a functional tyrosine kinase activity, and several truncated isoforms TrkB-T1, TrkB-T2 and TrkB-Shc which all lack kinase activity. In this study, we show that in cortical astrocytes, AMPc/PKA and ATP/CaMK signaling pathways mediate CREB activation leading to TrkB-T1 up-regulation. In cortical neurons, cAMP/PKA-dependent CREB activation mediates TrkB-FI and TrkB-T1 up-regulation. This activation was mediated by the CRE sequences present in the TrkB P2 promoter. These findings provide the molecular basis for the increase of TrkB expression found in different adaptive/pathological responses in which CREB has been involved. Furthermore, we demonstrate that excitotoxic NMDA receptor over-stimulation causes TrkB-T1 up-regulation, and TrkB-FI down-regulation in cortical neuron cultures. This change in expression pattern of the *trkB* isoforms is directly linked to the excitotoxic neuronal cell death. Thus, neurospecific TrkB-FI over-expression using a lentiviral system, reduced excitotoxicity in these cultures, meanwhile TrkB-T1 over-expression produced the opposite effect. Up-regulation of truncated TrkB is also found in ischemia (an *in vivo* model of excitotoxicity) which further supports that *trkB* isoform expression is regulated in pathological conditions associated with NMDA receptors over-stimulation.



## Índice

Abreviaturas y acrónimos .....	12
1. Introducción .....	14
1.1 La familia de las neurotrofinas y sus receptores .....	15
1.1.1. Revisión histórica.....	15
1.1.2 Papel de las neurotrofinas. ....	16
1.1.3 Receptores de neurotrofinas.....	17
1.1.4 Estructura y función de los receptores Trk. ....	18
1.1.5 Activación de los receptores de neurotrofinas. ....	20
1.2 El receptor de neurotrofinas TrkB.....	24
1.2.1 Isoformas del receptor TrkB. ....	24
1.2.2 Expresión de TrkB. ....	25
1.2.3 Activación y señalización de los receptores TrkB. ....	26
1.2.4 Regulación de la expresión de TrkB. ....	30
2. Objetivos .....	33
3. Materiales y métodos .....	35
3.1 Cultivos celulares.....	36
3.1.1 Cultivos primarios de neuronas corticales. ....	36
3.1.2 Cultivos primarios de astrocitos corticales. ....	36
3.1.3 Cultivo de células Neuro2a-cerbA.....	37
3.2 Análisis de los ARN mensajeros.....	37
3.2.1 Obtención y preparación del ARN total.....	37
3.2.2 Ensayos de protección frente a ARNasas (RPA; <i>Ribonuclease protection assay</i> ). ....	37
3.2.3 Ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR; <i>quantitative Real Time-PCR</i> ). .....	38
3.3 Análisis proteico.....	38

3.3.1 Ensayos de <i>Western Blot</i> (WB).....	38
3.3.2 Ensayos de Inmunocitoquímica. ....	39
3.4 Generación de Plásmidos y lentivirus. ....	39
3.5 Transfecciones e infecciones.....	41
3.6 Ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA).....	41
3.6.1 Extractos proteicos nucleares. ....	41
3.6.2 Unión <i>in vitro</i> a DNA y análisis.....	42
3.7 Ensayos de viabilidad y muerte neuronal <i>in vitro</i> . ....	42
3.8 Estudios <i>in vivo</i> . ....	43
3.8.1 Modelo animal de isquemia cerebral focal. ....	43
3.8.2 Ensayos de Inmunohistoquímica. ....	44
4. Resultados .....	46
4.1. Estudio de la regulación de la expresión del receptor de neurotrofinas TrkB en cultivos primarios de astrocitos corticales. ....	47
4.1.1 La activación de la ruta AMPc/PKA/CREB aumenta la expresión de TrkB-T1 en cultivos primarios de astrocitos corticales. ....	47
4.1.1.1 Forskolina incrementa la expresión de TrkB-T1 a nivel de proteína y ARNm. ....	47
4.1.1.2 Forskolina incrementa los niveles de fosforilación del factor de transcripción CREB. ....	49
4.1.1.4 PKA/CREB median la activación del promotor P2 de <i>trkB</i> por Forskolina. ....	51
4.1.2 La activación de receptores purinérgicos induce la expresión de TrkB-T1 en cultivos primarios de astrocitos corticales por activación de la ruta $\text{Ca}^{2+}$ /CaMK/CREB. ....	53
4.1.2.1 ATP estimula la fosforilación de CREB en astrocitos.....	55
4.1.2.2 ATP incrementa la expresión de TrkB-T1 a nivel de proteína y ARNm.....	55
4.1.2.3 La ruta de señalización $\text{Ca}^{2+}$ /CaMK media la activación del promotor P2 de <i>trkB</i> de manera dependiente de ATP. ....	56

4.1.3 Contribución de cada elemento CRE a la activación del promotor P2 de <i>trkB</i> por PKA y CaMKIV.....	58
4.2. Estudio de la regulación de la expresión del receptor de neurotrofinas TrkB en cultivos primarios de neuronas corticales.....	60
4.2.1 Incremento de la expresión de las isoformas del gen <i>trkB</i> de manera dependiente de Forskolina.....	60
4.2.2 CREB interacciona con los elementos trkB-CREs presentes en el gen <i>trkB</i> . ....	61
4.2.3 Los elementos trkB-CREs y CREB son necesarios para la activación del promotor P2 en respuesta a Forskolina. ....	64
4.2.4 PKA media la activación de la transcripción del promotor P2 de <i>trkB</i> en neuronas corticales en respuesta a Forskolina.....	65
4.2.5 El segundo elemento trkB-CRE es responsable de la transactivación y unión de CREB mediada por Forskolina.....	67
4.3. Estudio de la regulación del receptor de neurotrofinas TrkB en excitotoxicidad: implicación en el proceso de muerte neuronal.....	69
4.3.1 Cambio en la expresión de las isoformas de TrkB en cultivos primarios de neuronas corticales en situación de excitotoxicidad.....	70
4.3.3 Asociación entre la muerte neuronal por excitotoxicidad y los cambios en la expresión de las isoformas del receptor de neurotrofinas TrkB. ....	73
4.3.4 Contribución de la regulación de la expresión de TrkB a la muerte neuronal por excitotoxicidad. ....	75
4.3.5 Inducción de TrkB-T1 en neuronas corticales en un modelo de excitotoxicidad in vivo. ....	77
5. Discusión.....	80
5.1 Regulación de la expresión de las isoformas de TrkB. ....	81
5.2 Regulación de la expresión de TrkB dependiente de CREB.....	83
5.3 Relevancia fisiológica de la regulación de TrkB dependiente de CREB.....	86
5.4 Regulación de TrkB en excitotoxicidad.....	87

5.5 Implicaciones de la regulación de TrkB en isquemia cerebral y otras patologías con componente excitotóxico. ....	88
6. Conclusiones .....	92
7. Bibliografía .....	94
8. Publicaciones.....	112

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

**8Br-cAMP** – 8-bromo-3'-5'- ciclo adenosina monofosfato

**ACM** – Arteria cerebral media

**ActD** – Actinomicina D

**AMPc** – 3'-5'- ciclo adenosina monofosfato

**APV** – ácido 2-amino-fosfopantenoico

**ARNm** – ARN mensajero

**BDNF** – Factor neurotrófico derivado del cerebro

**CaMK** – Proteína kinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina

**CAT** – Cloranfenicol acetil transferasa

**CRE** – Elemento de respuesta a AMPc y  $\text{Ca}^{2+}$

**CREB** – Proteína de unión a los elementos CRE

**D.E** – Desviación estándar

**DIV** – Días *in vitro*

**dNTP** – Deoxinucleótido trifosfato

**DRG** – Ganglio de la espina dorsal

**DsRED** – Proteína roja fluorescente

**DTT** – DL-Ditiotreitol

**EGFP** – Proteína verde fluorescente potenciada

**EGTA** – Ácido etilendiaminotetracético

**EMSA** – Ensayos de retardo de la movilidad electroforética

**FK** – Forskolina

**GFAP** – Proteína ácida fibrilar de la glía

**HRP** – Peroxidasa de rábano blanco

**LDH** – Lactato deshidrogenasa

**LRM** – Motivos ricos en leucina

**LTP** – Memoria a largo plazo

**Luc** – Luciferasa

**MCAO** – Oclusión de la arteria media cerebral

**MTT** – D, 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio

**NGF** – Factor de crecimiento nervioso

**NMDA** – N-Metil-D-Aspartato

**NMDAR** – Receptor de glutamato para NMDA

**NR2B** – Subunidad del receptor de glutamato para NMDA tipo 2B

**NT-3** – Neurotrofina 3

**NT-4/5** – Neurotrofina 4/5

**NT-6** – Neurotrofina 6

**NT-7** – Neurotrofina 7

**p75<sup>LNTR</sup>** – Pan receptor de baja afinidad de 75 kDa para neurotrofinas

**PBS** – Solución salina tamponada con fosfato

**PKA** – Proteína kinasa dependiente de AMPc

**qRT-PCR** – Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

**RPA** – Ensayo de protección a la actividad de las enzimas RNasas

**SNC** – Sistema nervioso central

**SNP** – Sistema nervioso periférico

**SYN** – Promotor del gen *sinapsina I* humano

**TBS** – Tampón Tris salino

**TBE** – Tampón salino compuesto con Tris-HCl, Borato y EDTA.

**Trk** – Receptor tirosina kinasa de neurotrofinas relacionado con la tropomiosina

**TrkB** – Receptor Trk tipo B

**trkB-CREs** – Elementos de respuesta a AMPc y C2+ localizados en la región promotora 2 del gen *trkB*.

**TrkB-FI** – Receptor de neurotrofina TrkB con actividad tirosina kinasa

**TrkB-T1** – Receptor de neurotrofina TrkB truncado tipo 1

**TrkB-T2** – Receptor de neurotrofina TrkB truncado tipo 2

**TrkB-T-Shc** – Receptor de neurotrofina TrkB truncado con dominio Shc

**UTR** – Región de ARNm sin traducción

**WPRE**: elemento de regulación post-transcripcional del virus de la hepatitis de marmota

## **1. Introducción**



## 1.1 La familia de las neurotrofinas y sus receptores

### 1.1.1. *Revisión histórica.*

Los trabajos revolucionarios de Santiago Ramón y Cajal sobre “la doctrina neuronal” y la ley de la polaridad funcional de la neurona, abrieron un nuevo camino a los estudios sobre la interconexión nerviosa, la individualidad neuronal y su capacidad de transmisión del impulso nervioso (Andres-Barquin, 2002). Los experimentos realizados por Victor Hamburger durante la década de los años 1930, posibilitaron el comienzo del estudio molecular de los mecanismos que controlan el desarrollo neuronal. En sus trabajos, Hamburger demostraba la presencia de algún tipo de factor capaz de producir el crecimiento nervioso (Hamburger, 1939). Éste fue descubierto por el grupo de Levi-Montalcini en el año 1954 a partir de una sustancia derivada de un sarcoma de ratón. Lo denominaron factor de crecimiento nervioso (*Nerve growth factor*. NGF) (Cohen et al., 1954), y se caracterizaba por producir hiperplasia, hipertrofia celular, aceleración de la diferenciación de los ganglios y una distribución atípica de las fibras nerviosas al implantar el tumor del que procedía en un embrión de pollo de 3 días. Posteriormente, se comprobó que las neuronas de los ganglios

periféricos eran capaces de transportar de manera retrógrada el factor NGF a través de los axones. La prevención de dicho transporte provocaba una marcada muerte neuronal, que se impedía por la aplicación exógena de NGF (Levi-Montalcini, 1987); (Thoenen and Stockel, 1975). Poco después se postulaba la teoría neurotrófica según la cuál este factor trófico controlaba la población neuronal, al producirse en cantidades limitantes por los órganos diana durante el desarrollo embrionario, controlando así el número de neuronas capaces de inervar los distintos tejidos. A pesar de la gran cantidad de estudios realizados sobre la funcionalidad del NGF (Levi-Montalcini, 1987), se sabía que no todas las neuronas respondían a la aplicación de este factor, lo que indicaba la existencia de otros factores neurotróficos que pudieran mantenerlas de manera específica. En 1982, se purificó, a partir de extractos de cerebro de cerdo, una proteína capaz de promover la supervivencia de neuronas de los ganglios de la raíz dorsal de la médula espinal (DRG; *dorsal root ganglia*) en cultivo que, al igual que el NGF, era capaz de impedir la muerte neuronal natural que ocurría durante el desarrollo en embriones de pollo (Barde et al., 1982). Esta nueva molécula se denominó factor neurotrófico derivado del cerebro (*Brain derived neurotrophic factor*, BDNF). La purificación de esta proteína y su caracterización revelaron un alto grado de

homología con el NGF (Leibrock et al., 1989), lo que indicaba que ambas pertenecían a un grupo de factores de crecimiento que acabó por denominarse familia de las neurotrofinas. En la actualidad, esta familia queda constituida por 6 miembros: NGF, BDNF, neurotrofina-3 (*Neurotrophin-3*, NT-3) (Ernfors et al., 1990); (Hohn et al., 1990), neurotrofina-4/5 (NT-4/5) (Berkeimeier et al., 1991); (Hallböök et al., 1991); (Ip et al., 1992), neurotrofina-6 (NT-6) (Götz et al., 1994), y neurotrofina-7 (NT-7) (Nilsson et al., 1998). Todas ellas, a excepción de la NT-6 y NT-7, han sido caracterizadas en una amplia variedad de especies de vertebrados. Presentan un alto grado de homología, sugiriendo su importancia para el mantenimiento del sistema nervioso de los vertebrados (Hallböök et al., 1991).

### 1.1.2 Papel de las neurotrofinas.

Acorde al papel que ejercen las neurotrofinas durante el desarrollo embrionario, se observó que los ratones que habían sido genéticamente modificados para impedir la expresión de éstas, morían durante las primeras semanas después del nacimiento, como consecuencia de las graves alteraciones de los sistemas nervioso central (SNC) y periférico (SNP) (Chao, 2003). La caracterización del papel de estos factores se realizó en ratones

heterocigóticos, en los cuales la expresión de cada neurotrofina estaba reducida a la mitad por falta de uno de los alelos (Tabla 1). En los ratones *ngf*<sup>+/-</sup> se observó una disminución en la innervación de neuronas colinérgicas en el hipocampo, deficiencias en la adquisición de la memoria y un menor número de neuronas en el SNP (Chen et al., 1997); (Crowley et al., 1994). Los ratones *bdnf*<sup>+/-</sup> presentaban una gran agresividad, hiperactividad e hiperfagia, defectos en la memoria a largo plazo (*long term potentiation*, LTP) y déficit en los niveles de serotonina, lo que implicaba un funcionamiento incorrecto tanto de la corteza como del hipotálamo y el hipocampo (Lyons et al., 1999); (Dluzen et al., 2001); (Korte et al., 1995); (Carroll et al., 1998); (Ernfors et al., 1994a). Los ratones *nt-3*<sup>+/-</sup> presentaban defectos cardiovasculares y pérdida de neuronas del SNP (Ernfors et al., 1994b); (Donovan et al., 1996); (Elmer et al., 1997). En contraposición, los ratones homocigotos *nt-4/5*<sup>+/-</sup> no presentaban anomalías fenotípicas claras, siendo el SNP y el SNC aparentemente normales, y únicamente observó una reducción en el mismo de neuronas geniculares, que se encontraron en menor número (Conover et al., 1995); (Liu et al., 1995). Hoy en día sabemos que las distintas neurotrofinas desempeñan funciones diferentes, a pesar de su gran homología. Así, la administración exógena de NGF durante el desarrollo embrionario previene la muerte de

Tabla 1. Haploinsuficiencia de neurotrofinas

Ratones *ngf*<sup>+/-</sup>

- Disminución en la innervación de neuronas colinérgicas del hipocampo.
- Deficiencias en la adquisición de la memoria.
- Pérdida de neuronas en el SNP

Ratones *bdnf*<sup>+/-</sup>

- Hiperfagia y obesidad.
- Defectos en LTP.
- Déficit en los niveles de serotonina.
- Pérdida de neuronas en el SNP.

Ratones *nt-3*<sup>+/-</sup>

- Defectos cardiovasculares.
- Pérdida de neuronas en el SNP.
- Pérdida de mecanorreceptores cutáneos.

Ratones *nt-4*<sup>+/-</sup>

- Reducción del número de neuronas geniculares.

las neuronas de los ganglios sensoriales (Harper and Thoenen, 1981), mientras que en el adulto su principal diana en el SNC son las neuronas colinérgicas, regulando la expresión de acetilcolina (Mobley et al., 1986); (Li et al., 1995) y en el SNP la población de neuronas de la médula espinal y de los ganglios superiores. *In vitro*, el BDNF es capaz de mantener la supervivencia de neuronas corticales embrionarias (Nawa et al., 1993), así como de células ganglionares de la retina (Johnson et al., 1996), células colinérgicas, dopaminérgicas y neuronas granulares del cerebelo (Hyman et al., 1991); (Lindholm et al., 1993); (Segal et al., 1992). La NT-3 dirige funciones tróficas tanto en el SNC como en el SNP, promoviendo la diferenciación de las células de Purkinje y granulares del cerebelo. Además, mantiene la supervivencia y diferenciación de neuronas tanto gabaérgicas como dopaminérgicas

(Hyman et al., 1994). Por otra parte, las neurotrofinas en su forma no madura, denominada pro-neurotrofinas, también son capaces de tener actividad y desempeñar funciones relacionadas con la muerte neuronal por apoptosis, representando así un rol opuesto al que tienen cuando se presentan en su forma madura (Kolbeck et al., 1994); (Lee et al., 2001b); (Nykjaer et al., 2004); (Teng et al., 2005).

### 1.1.3 Receptores de neurotrofinas.

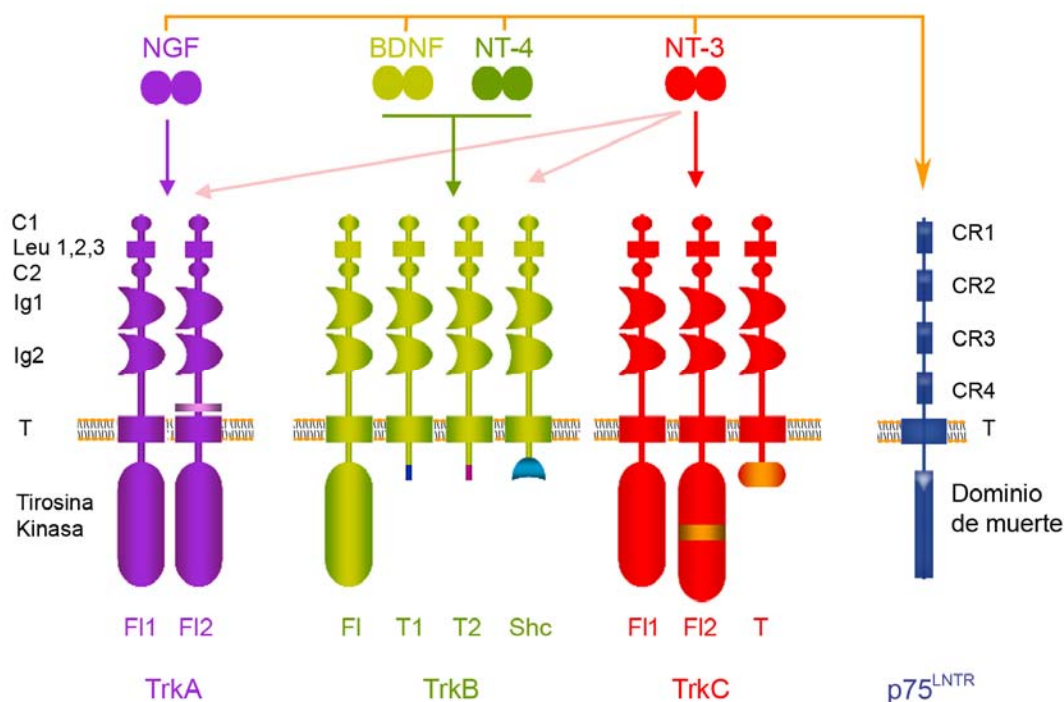
A pesar de que se sospechaba que la acción del NGF estaba mediada por su unión a un receptor presente en la membrana celular, dicha proteína no se caracterizó hasta 1989 a partir de un carcinoma de colon humano (Martín-Zanca et al., 1989). Esta proteína, que pasó a denominarse gp140 o TrkA (*tropomyosin-related kinase receptor A*), se identificó como el producto de un oncogén perteneciente a la familia de los receptores con actividad tirosín kinasa. En el mismo año se publicó la existencia de un receptor expresado en el SNC y SNP, altamente relacionado y perteneciente a la misma familia que TrkA. Éste pasó a denominarse gp145 o TrkB (Klein et al., 1989). Poco después, en 1991, se describió que TrkA y TrkB eran receptores de alta afinidad para las neurotrofinas NGF y BDNF respectivamente

(Kaplan et al., 1991); (Klein et al., 1991b); (Klein et al., 1992). Casi al mismo tiempo se caracterizó el receptor de alta afinidad de la NT-3, al que se denominó TrkC (Lambelle et al., 1991), y se comprobó que la NT-4/5 se unía con alta afinidad a TrkB (Klein et al., 1992), mientras que NT-3 era capaz de unirse a TrkA y TrkB con menor afinidad que a TrkC (Klein et al., 1991). Además de estos receptores de alta afinidad, ya en 1986 se había identificado un receptor de baja afinidad para NGF que se denominó p75<sup>LNGFR</sup> (*Low affinity Nerve growth factor receptor of 75 kDa*), al que nos referiremos en adelante como p75 (Johnson et al., 1986b). Este receptor presentaba la capacidad de unir con baja afinidad las diferentes neurotrofinas descritas hasta entonces (Rodríguez-Tébar et al., 1990); (Hallbook et al., 1991); (Hempstead et al., 1991).

#### 1.1.4 Estructura y función de los receptores Trk.

Todos los receptores Trk se caracterizan por presentar un dominio extracelular compuesto por dos regiones ricas en cisteína (Fig. 1), un tándem de tres elementos ricos en leucina y dos dominios globulares similares a los presentes en las inmunoglobulinas. Se encuentran anclados a la membrana plasmática a través de un único dominio

helicoidal. En la región citoplásmica presentan un dominio con actividad tirosina kinasa. La función de estos receptores está determinada por tres factores: 1.- la presencia de diferentes isoformas, 2.- la unión de sus ligandos específicos y 3.- su distribución en el organismo. El gen *trkA* origina dos isoformas (Fig. 1), una de expresión neuronal (Fl-2) y otra no neuronal (Fl-1). La forma neuronal presenta una inserción de 6 aminoácidos en la región del dominio extracelular más cercana al dominio transmembrana, lo que le permite ser activada más eficientemente por la NT-3 (Clary and Reichardt, 1994). La distribución del ARNm de TrkA en el sistema nervioso se encuentra restringida a estructuras muy definidas, precisamente aquellas que responden a NGF (Chao, 2003); (Reichardt, 2006). Éstas incluyen la región basal del cerebro, el estriado y el tálamo en el SNC, y las neuronas DRG en el SNP (Barbacid, 1995). Su ARNm puede ser detectado en el desarrollo embrionario de ratón en torno al día 9 de gestación, y a partir del día 13 en los ganglios sensoriales y simpáticos (Martín-Zanca et al., 1990). El fenotipo de los ratones a los que se les ha eliminado la expresión de TrkA es muy similar al de los ratones sin expresión de NGF, excluyendo así efectos compensatorios debidos a la unión de la NT-3 o la NT-4/5 (Smeyne et al., 1994); (Snider, 1994). El gen *trkB* es mucho más complejo. Es capaz de generar una isoforma con una



**Figura 1. Los receptores de neurotrofinas.** Esquema donde se muestran las diferentes isoformas de los receptores de alta afinidad de neurotrofinas pertenecientes a la familia Trk. Estos receptores presentan una región extracelular constituida por dos regiones ricas en cisteínas (C1, C2), un tándem de tres elementos ricos en leucinas (Leu 1, 2, 3) y dos dominios globulares similares a los de las inmunoglobulinas (Ig1, Ig2). El dominio transmembrana (T) conecta con la región citoplásmica donde se localiza un dominio tirosina kinasa, presente únicamente en las isoformas completas (FI). El receptor de baja afinidad de neurotrofinas p75<sup>L<sup>NTR</sup></sup> presenta un dominio citoplásmico implicado en la muerte celular, un dominio transmembrana y una región extracelular con cuatro repeticiones ricas en cisteínas (CR). La capacidad de unión de las distintas neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 y NT-4 a los diferentes receptores queda reflejada en el esquema. La neurotrofina NT-3 se une además con baja afinidad a los receptores TrkA y TrkB.

delección del dominio extracelular que le confiere menor afinidad por las neurotrofinas NT-4/5 y NT-3 (Strohmaier et al., 1996). Además se han caracterizado en ratón 3 isoformas que no presentan el dominio citoplásmico tirosina kinasa (Fig. 1), siendo por tanto catalíticamente inactivas. La forma completa (TrkB-FI) se localiza en neuronas tanto del SNC como SNP, mientras que las isoformas catalíticamente inactivas o truncadas se localizan preferentemente en las

células gliales y otros tejidos no neuronales (Klein et al., 1991a); (Middlemas et al., 1991); (Armanini et al., 1995); (Ninkina et al., 1996). Las características fenotípicas de los ratones genéticamente modificados para la expresión de TrkB se explican con detalle en la sección 1.2.3. El gen *trkC* genera dos formas catalíticamente activas (Fig. 1) que se expresan tanto en tejidos neuronales como no neuronales, aunque predominan en las neuronas del SNC (Tsoulfas et al., 1993);

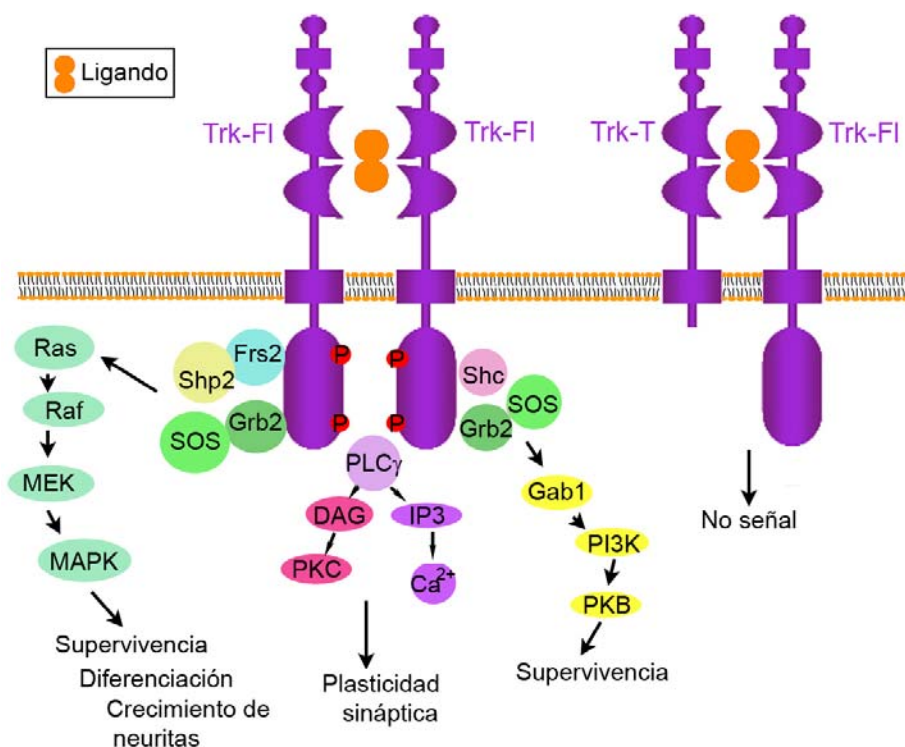
(Valenzuela et al., 1993) (Lambelle et al., 1993). Además se genera por procesamiento alternativo una isoforma truncada que se expresa mayoritariamente en las células de la glia (Tsoulfas et al., 1993); (Valenzuela et al., 1993). Los ratones *trkC*<sup>-/-</sup> muestran alteraciones menos severas que los *nt3*<sup>+/-</sup>, a pesar de que se ven afectadas las mismas poblaciones neuronales, lo que sugiere que TrkC es estrictamente activado por la NT-3, mientras que la NT-3 puede señalizar también a través de los receptores TrkA y TrkB (Ernfors et al., 1994b); (Klein, 1994); (Barbacid, 1994). El receptor de baja afinidad de las neurotrofinas p75 (Chao et al., 1986); (Johnson et al., 1986a); (Roux and Barker, 2002) pertenece a la familia del receptor de necrosis tumoral, y es capaz de unir todas las neurotrofinas con afinidad similar (Rodríguez-Tébar et al., 1990); (Rodríguez-Tebar et al., 1992). Este receptor presenta una región extracelular compuesta por cuatro dominios ricos en cisteínas (Fig. 1), un único dominio transmembrana con estructura helicoidal y un dominio citoplásmico de anclaje de diferentes proteínas implicadas en muerte neuronal. Este receptor ejerce un doble papel, por un lado es capaz de asociarse a los receptores Trk aumentando la afinidad de éstos por sus ligandos, y por otro lado puede promover la muerte neuronal en ausencia de estos receptores (Lee et al., 2001a; Lee et al., 2001c). Así, la coexpresión de p75 con TrkA

promueve una mayor afinidad de éste por NGF (Hempstead et al., 1991); (Benedetti et al., 1993) y potencia la activación de TrkA mediada por NGF (Verdi et al., 1994), hasta tal punto que la interrupción de la unión de p75 impide la activación de TrkA por NGF (Barker and Shooter, 1994). Además, p75 es capaz de alterar la especificidad o preferencia de los receptores Trk por sus ligandos. Por ejemplo, el BDNF, y las neurotrofinas NT-4/5 y NT-3 son capaces de unirse a TrkB, pero sólo el BDNF es capaz de inducir la activación de TrkB en presencia de p75 (Bibel et al., 1999). Los efectos proapoptóticos del receptor p75 se corroboraron en ratones *p75*<sup>-/-</sup>, los cuales presentaban durante el desarrollo una disminución de la apoptosis tanto en la retina como en la médula espinal (Frade and Barde, 1999). De manera opuesta, ratones transgénicos que sobreexpresan el dominio intracelular de p75 presentan un reducido número de neuronas corticales, simpáticas y sensoriales (Majdan et al., 1997).

#### *1.1.5 Activación de los receptores de neurotrofinas.*

La dimerización de los receptores Trk de manera dependiente a la unión del ligando (Fig. 2) (Jing et al., 1992), produce la transfosforilación de residuos específicos de tirosina que sirven como sitios de anclaje para diferentes moléculas adaptadoras (Obermeier





**Figura 2. Rutas de señalización de los receptores de neurotrofinas.** La unión de las neurotrofinas a los receptores Trk completos (Trk-FI) permite la transfosforilación de éstos en diferentes residuos, y la activación de diversas cascadas de señalización implicadas en plasticidad sináptica, supervivencia y diferenciación neuronal. La dimerización de un receptor Trk truncado (Trk-T) con un receptor Trk-FI impide la señalización dependiente de la unión de ligando. Frs2, *fibroblast growth factor receptor substrate 2*; Grb2, *growth factor receptor-bound protein 2*; SOS, *son of sevenless*; Shp2, *Shc homology protein 2*. Ras, *GTP binding protein*; Raf, *MAP-Kinase-Kinase*; MAPK, *mitogen activated protein kinase*; MEK, *MAPK/ERK Kinase*; PLC $\gamma$ , *phospholipase C gamma*; DAG, *diacylglycerol*; PKC, *protein kinase C*; IP3, *inositol-1, 4, 5-triphosphate*; Ca<sup>2+</sup>, *calcio*; Shc, *adaptor protein with SH2 domain*; Gab1, *Grb2-associated binder 1*; PI3K, *phosphatidylinositol-3-kinase*; PKB, *protein kinase B*.

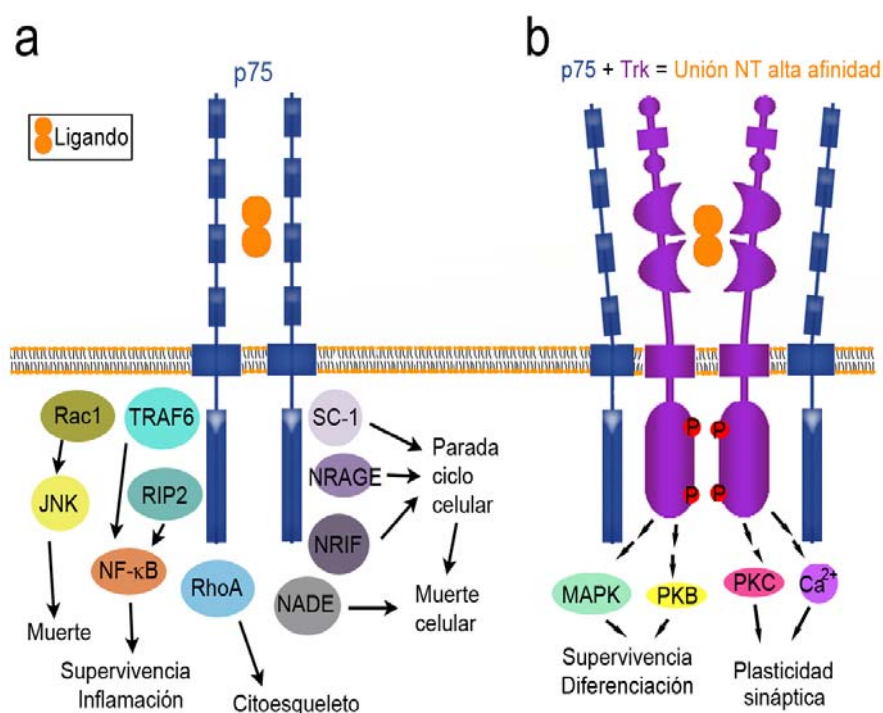
et al., 1993); (Stephens et al., 1994). Este evento dispara la activación de las rutas de señalización que promueven la prevención de la muerte celular y la diferenciación neuronal. Tres son las cascadas de señalización activadas principalmente por los receptores Trk y sus substratos (Fig. 2). Primero, la activación de la vía Ras/Raf/MEK/MAPK como resultado de la formación de complejos

de moléculas adaptadoras. Así, la forma fosforilada de Shc se une al complejo Grb2-SOS, el cuál es capaz de activar Ras, y MAPK es activada a través de Raf y MEK. De manera similar, la proteína FRS2 fosforilada se asocia a Grb2-SOS a través de la proteína SHP-2/, activando la misma ruta (Kouhara et al., 1997); (Wright et al., 1997); (Hadari et al., 1998). Se han encontrado otras moléculas

adaptadoras capaces de formar complejos con Grb2/SOS, tales como rAPS y SH2-B (Qian et al., 1998). La segunda cascada de señalización activada por los receptores Trk es la dependiente de las proteínas adaptadoras Gab-1 (*Grb-associated binder-1*), que median la asociación y activación de la proteína PI3K (*Phosphatidylinositol 3 kinase*) (Holgado-Madruga et al., 1997); (Yamada et al., 1997). Esta kinasa se encuentra especialmente relacionada con la supervivencia neuronal vía la activación de la kinasa PKB/AKT (*Protein Kinase B*) (Franke et al., 1997a; Franke et al., 1997b); (Crowder and Freeman, 1998), que resulta a su vez en la fosforilación e inactivación de la proteína proapoptótica BAD, perteneciente a la familia Bcl-2 (Datta et al., 1997). PKB/AKT induce la fosforilación de los factores de transcripción tipo *Forkhead*, los cuales controlan la expresión de genes implicados en la muerte celular, tales como el ligando de Fas (Brunet et al., 1999). La tercera ruta de señalización que activan los receptores Trk es la dependiente de la PLC $\gamma$  (Fosfolipasa C gamma), que regula los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup> así como la actividad de la proteína kinasa C (PKC), vía ruptura del sustrato PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-difosfato) a DAG (Diacilglicerol) e IP3 (Inositol trifosfato) (Fig. 2). Esta ruta parece jugar un papel muy importante en la liberación de las neurotrofinas y plasticidad sináptica (Canossa

et al., 1997). Además se ha encontrado que la ruta de señalización dependiente de la PLC $\gamma$  regula la proteína neuroespecífica periferina, un constituyente de los filamentos intermedio (Loeb et al., 1994). Debido a la presencia de diversas isoformas de las proteínas adaptativas que se unen a la región citoplásmica de los receptores Trk, parece que cada uno de ellos es capaz de activar diferentes rutas de señalización a pesar de su gran similitud, hecho que podría explicar que la activación de TrkA por NGF y de TrkC por NT-3 en neuronas simpáticas promueva efectos biológicos diferentes. Incluso la activación del mismo receptor Trk por distintos ligandos puede dar lugar a diferentes eventos de señalización, como ocurre en el caso de la activación de TrkB por BDNF o por NT-4/5. Estudiando ratones transgénicos en los que el gen *bdnf* se sustituyó por el de *nt-4/5*, se observó que dichos ratones presentaban un mayor número de neuronas sensoriales, una reducción del peso corporal, e infertilidad (Fan et al., 2000), indicando la especificidad de la acción de cada neurotrofina a través de TrkB. Así mismo, la activación de TrkA en neuronas simpáticas por NGF o NT-3 es capaz de regular de manera diferente la supervivencia y la neuritogénesis (Belliveau et al., 1997). Finalmente, la funcionalidad del receptor p75 depende del contexto celular en el cuál se exprese. Puede promover por sí solo, y una





**Figura 3. Señalización del receptor de neurotrofinas p75.** (a) La unión de las neurotrofinas al receptor p75 permite su dimerización, la activación de diferentes factores como NF-κB y la proteína JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) y la modulación de la actividad de la proteína Rho. Estas respuestas están mediadas a través de proteínas adaptadoras que se unen al dominio citoplásmico de p75, incluyendo NRIF (*neurotrophin-receptor interacting protein*), NADE (*neurotrophin associated cell death executor*), NRAGE (*neurotrophin-receptor-interacting MAGE homologue*), SC1 (*Schwann cell 1*) y RIP2 (*Receptor-interacting protein 2*) y TRAF6 (*tumour necrosis factor receptor-associated factor 6*) las cuales se encuentran involucradas en apoptosis, supervivencia, elongación de las neuritas y parada del ciclo celular. (b) La interacción entre p75 y los receptores de la familia Trk produce cambios en la afinidad de unión por las neurotrofinas. MAPK, *mitogen activated protein kinase*. PKB, *protein kinase B*; PKC, *protein kinase C*; Ca<sup>2+</sup>, calcio.

vez unido a su ligando, la activación de las cascadas de muerte celular programada mediadas por activación de caspasas y de la proteína proapoptótica Jun Kinasa (JNK) (Fig. 3a) (Dobrowsky et al., 1994); (Liu et al., 1996; Wiegmann et al., 1994); (Hamanoue et al., 1999); (Bamji et al., 1998); (Yoon et al., 1998). Otras proteínas implicadas en la activación de muerte celular por 75 son NRIF (*Neurotrophin receptor-interacting factor*) (Casademunt et al., 1999), NRAGE

(*neurotrophin receptor-interacting MAGE*) que media apoptosis en los precursores de las neuronas simpáticas (Salehi et al., 2000a; Salehi et al., 2000b) y NADE (*p75 NTR-associated cell death executor*), que se une a p75 en presencia de NGF, pero no de BDNF, NT-3 ó NT-4 (Mukai et al., 2000). Además, p75 es capaz de interactuar con los receptores Trk para modular su activación cuando ambos tipos de receptores se expresan en la misma célula (Fig. 3b) (Davey and

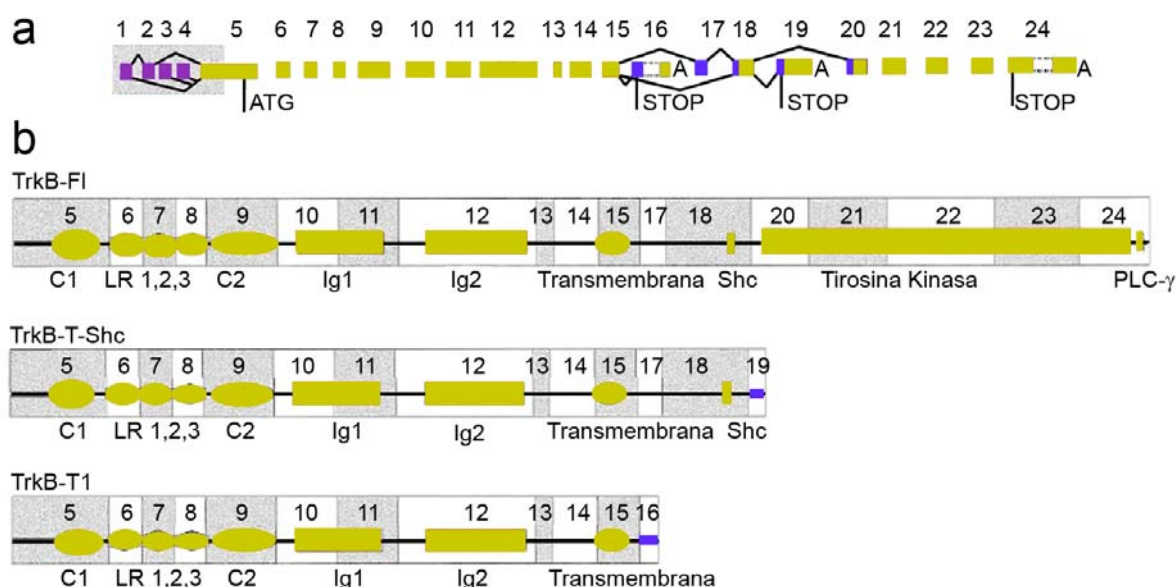
Davies, 1998); (Ladiwala et al., 1998). Tanto los dominios citoplásmico como extracelular participan en dicha interacción, la cuál a su vez depende del estado de fosforilación del receptor Trk (Bibel et al., 1999). Esta interacción es relevante en varios sentidos. Primero, porque la asociación entre ambos posibilita la unión de alta afinidad de las neurotrofinas, lo cuál es fundamental dada la limitación de neurotrofinas *in vivo* (Hempstead et al., 1991); (Benedetti et al., 1993); (Lee et al., 1994a; Lee et al., 1994b); (Horton et al., 1997). Segundo, porque la asociación incrementa la discriminación de los ligandos por los receptores Trk, lo cuál es especialmente importante en el caso de TrkA y TrkB, que unen más de una neurotrofina. Tercero, porque la proximidad de p75 y los receptores Trk en la membrana celular permite que las cascadas de señalización de ambos receptores puedan interactuar.

## 1.2 El receptor de neurotrofinas TrkB

### 1.2.1 Isoformas del receptor TrkB.

El gen *trkB*, que en humanos presenta una longitud aproximada de 590 Kb y 24 exones (Fig. 4a), da lugar a una gran diversidad de isoformas que se generan por procesamiento alternativo (Stoilov, 2002). En ratones se detectaron, mediante ensayos de *Northern*

*blot*, varios transcritos de este gen cuyos tamaños oscilaban entre 0.7 y 9 kb (Martín-Zanca et al., 1989); (Klein et al., 1989); (Klein et al., 1990a); (Middlemas et al., 1991). Sin embargo, sólo son tres las isoformas que se expresan de manera mayoritaria en humanos, principalmente en el cerebro (Fig. 4b). Una isoforma completa de 145 kDa denominada TrkB-FI (*TrkB-Full-length*), que contiene un dominio tirosina kinasa, y dos isoformas truncadas que se conocen como TrkB-T1 y TrkB-T-Shc, que carecen de ese dominio catalítico. En rata y ratón se caracterizó una tercera isoforma truncada minoritaria denominada TrkB-T2 (Klein et al., 1989); (Klein et al., 1990a); (Middlemas et al., 1991). Todas ellas poseen un dominio extracelular de idéntica secuencia aminoacídica (Fig. 4b), con una estructura similar al de los otros receptores de la familia Trk. En la región citoplásmica presentan un dominio yuxtamembrana que incluye un sitio de unión de proteínas Shc, el dominio tirosina kinasa y un sitio de anclaje de proteínas PLC $\gamma$ . Las isoformas truncadas T1 y T2, de un tamaño molecular de 95 kDa, únicamente difieren de la isoforma TrkB-FI en que los dominios citoplásmicos han sido sustituidos por una pequeña secuencia de 23 y 21 aminoácidos, respectivamente. De esta pequeña cola citoplásmica sólo los últimos 11 aminoácidos en el caso del TrkB-T1, y los últimos 9 en el caso del TrkB-T2, difieren tanto de la



**Figura 4. Procesamiento alternativo del gen *trkB* en humanos y estructura de las proteínas generadas.** (a) Patrón del procesamiento alternativo del gen humano *trkB*. Los exones se muestran como cajas numeradas. Los exones constitutivos se muestran en verde, los exones alternativos pertenecientes a la región 5'UTR en violeta y los exones alternativos de las diferentes secuencias codificantes en azul. (b) Estructura de las distintas proteínas TrkB presentes en humanos. El nombre de los diferentes dominios se encuentra indicado bajo las cajas: C1 y C2 son repeticiones ricas en cisteínas, LR1, 2 y 3 es un tándem de tres elementos ricos en leucinas, Ig1 e Ig2 son dominios globulares similares a los de las inmunoglobulinas. Shc y PLCγ indican los sitios de unión de dichas proteínas. Figura adaptada de [Stoilov et al., 2002](#).

secuencia del TrkB-FI como entre sí ([Middlemas et al., 1991](#)). La isoforma TrkB-T-Shc, que también carece del dominio tirosina kinasa, presenta un dominio capaz de unir proteínas del tipo Shc ([Stoilov, 2002](#)). Además de estas isoformas, producto del procesamiento alternativo de las secuencias codificantes para la región intracelular, se han descrito en ratón y rata otras que son incapaces de unir neurotrofinas debido a que carecen de uno o todos los motivos ricos en leucina de la región extracelular ([Ninkina et al., 1997](#)). Otra isoforma, también minoritaria, presenta una región yuxtamembrana extracelular modificada, lo que le confiere una

afinidad reducida por la NT-4/5 y, por tanto, una elevada afinidad por el BDNF ([Strohmaier et al., 1996](#)).

### 1.2.2 Expresión de *TrkB*.

Los ARNm que codifican las distintas isoformas de TrkB se expresan de manera abundante en el cerebro de los roedores a partir del día embrionario 9.5 ([Klein et al., 1990b](#)), y su expresión está regulada tanto espacial como temporalmente. Así, en el hipocampo, la cantidad de ARNm de TrkB-FI aumenta durante el desarrollo y alcanza su

nivel máximo alrededor del nacimiento, mientras que los niveles de los transcritos de TrkB-T1 lo hacen dos semanas más tarde (Dugich-Djordjevic et al., 1993); (Fryer et al., 1996); (Masana et al., 1993). Se ha observado una regulación temporal similar en la corteza cerebral, la amígdala, la médula espinal y las neuronas ganglionares de la espina dorsal, tanto en roedores (Ernfors et al., 1991); (Fryer et al., 1996) como en humanos (Muragaki et al., 1997). La distribución espacial de los distintos transcritos es diferente. Así, en el cerebro adulto la expresión del ARNm de TrkB-FI es evidente en las neuronas de las distintas capas de la corteza cerebral, el tálamo y el hipocampo (Armanini et al., 1995); (Beck et al., 1993); (Klein et al., 1990b). Por el contrario, los transcritos de TrkB-T1 se encuentran en los plexos coroideos, el epéndimo y en células no neuronales (Beck et al., 1993); (Biffo et al., 1995); (Frisen et al., 1993). Sin embargo, se ha observado colocalización de los ARNm de las isoformas de TrkB tanto en motoneuronas adultas como en las células de los ganglios trigéminos durante el desarrollo (Armanini et al., 1995); (Ninkina et al., 1996). Estos datos indican que, de manera general, los transcritos de TrkB-FI son los mayoritarios durante las etapas tempranas del desarrollo, mientras que los de TrkB-T1 lo son en las etapas más tardías y en el organismo adulto. De manera muy similar, la isoforma TrkB-FI es la más

abundante durante el desarrollo, mientras que el receptor TrkB-T1 lo es en el organismo adulto (Fryer et al., 1996). Mediante ensayos de inmunohistoquímica, se ha observado que TrkB se encuentra mayoritariamente presente en neuronas, principalmente en el hipocampo y en las estructuras corticales. Más concretamente, TrkB-T1 se expresa en el compartimento somato-dendrítico de las células hipocámpales, mientras que el receptor TrkB-FI se presenta en el segmento inicial de los axones, así como en las espinas dendríticas de las membranas postsinápticas y los terminales nerviosos (Drake et al., 1999). Esta distribución de los receptores TrkB también se mantiene, aparentemente, en cultivos primarios de neuronas hipocámpales y corticales (Haapasalo et al., 2002).

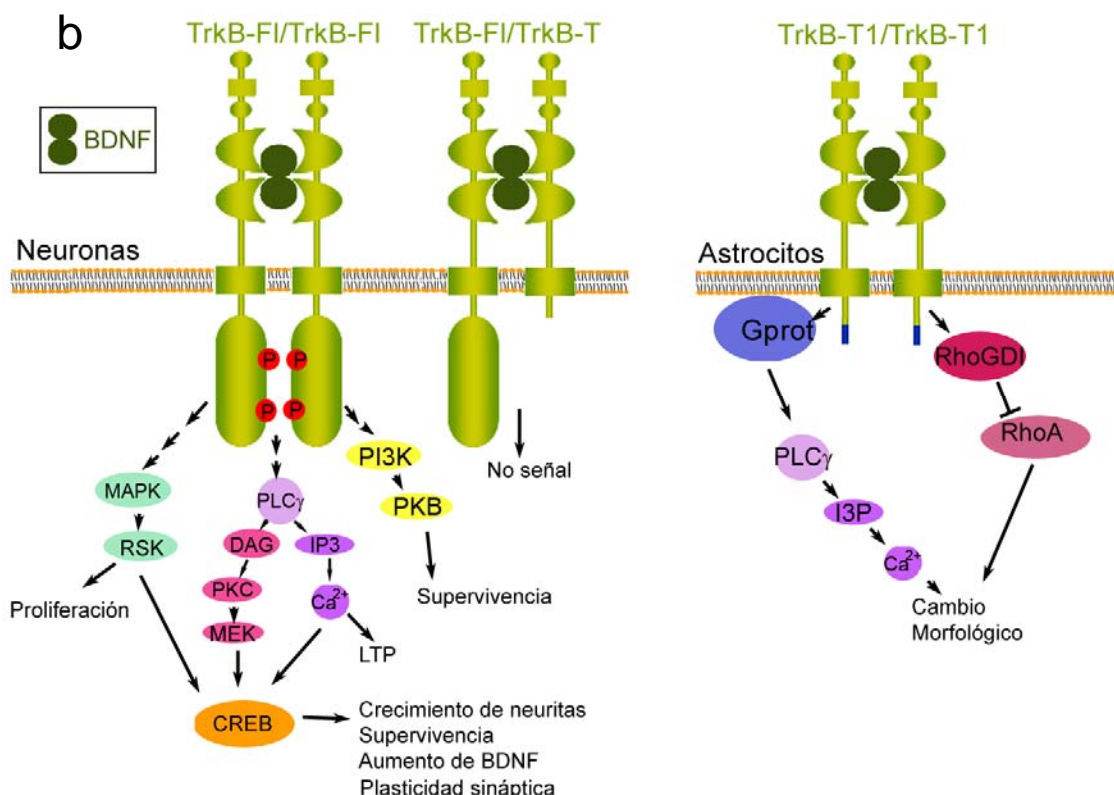
### *1.2.3 Activación y señalización de los receptores TrkB.*

La primera etapa en la activación del receptor TrkB-FI es la unión del ligando al dominio extracelular (Fig. 5a), lo que resulta en la formación de homodímeros TrkB-FI / TrkB-FI y la transfosforilación de residuos tirosina específicos presentes en el dominio kinasa citoplásmico (Ibanez et al., 1993); (Jing et al., 1992). De manera similar a lo que ocurre con los otros receptores Trk y que describimos anteriormente (Apartado 1.1.5; Fig. 2), la fosforilación de estos residuos proporciona,

sitios de anclaje para las proteínas adaptadoras Shc y FRS2, así como para la PLC $\gamma$  (Middlemas et al., 1991); (Stephens et al., 1994); (Vetter et al., 1991). De esta manera se activan distintas rutas de señalización como la vía de la PI3K, que permite la activación de la proteína PKB/AKT, o la cascada Ras-MAPK o PLC $\gamma$  que producirá la activación del factor de transcripción CREB (*cAMP/Ca<sup>2+</sup> response element-binding protein*). Esta activación de CREB mediará los efectos de BDNF en el crecimiento de neuritas, supervivencia neuronal y plasticidad sináptica (Tong and Perez-Polo, 1998); (Bonni et al., 1999); (Lonze and Ginty, 2002); (Huang and Reichardt, 2003); (Dragunow et al., 1994). La activación del receptor TrkB-FI también influye en las propiedades de la membrana plasmática en una escala temporal muy similar a la de los neurotransmisores clásicos (Kafitz et al., 1999); (Kafitz et al., 2000). La unión de un homodímero de neurotrofinas al dominio extracelular posibilita, además, la formación de heterodímeros TrkB-FI / TrkB-T1 (Fig. 5b), lo que produce la supresión de la señalización inducida por el ligando, debido a la pérdida de la capacidad de transfosforilación en estos heterodímeros (Ninkina et al., 1996); (Eide et al., 1996); (Haapasalo et al., 2001). Además, se ha postulado que la expresión de TrkB-T1 en células no neuronales y/o en condiciones patológicas podría limitar la difusión de

BDNF y, de esta manera, impedir la comunicación axonal con la zona dañada (Beck et al., 1993); (Biffo et al., 1995); (Fryer et al., 1997). Es importante señalar que a pesar de carecer del dominio citoplásmico tirosina kinasa, los homodímeros TrkB-T1 / TrkB-T1 y TrkB-T2 / TrkB-T2 son capaces de mediar respuestas celulares en presencia tanto de BDNF como de NT-4 en la línea celular *L-cells* (Baxter et al., 1997). Igualmente, BDNF produce en astrocitos a través de TrkB-T1 el incremento de los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup> (Rose et al., 2003). Más recientemente, se ha demostrado que en presencia de BDNF los homodímeros TrkB-T1 / TrkB-T1 son capaces de regular la morfología de astrocitos y células de glioma al controlar la activación de la proteína RhoA, implicada en la regulación del citoesqueleto de actina (Ohira et al., 2005); (Ohira et al., 2006). Estos datos indican que, si bien los receptores truncados pueden actuar como dominantes negativos de los receptores TrkB-FI cuando forman heterodímeros con ellos, también son capaces de activar rutas de señalización aún no caracterizadas cuando se constituyen en homodímeros en presencia de su ligando. Se ha comprobado que las respuestas controladas por TrkB dependen del tiempo de estimulación. Un pulso breve de BDNF es capaz de activar el potencial de membrana postsináptico y ejercer efectos sobre la LTP (Kafitz et al., 1999); (Schuman, 1999). Sin





**Figura 5. Rutas de señalización del receptor de neurotrofinas TrkB.** (a) La unión del factor BDNF permite, en neuronas, la formación de los dímeros TrkB-FI / TrkB-FI. Tras la trans-fosforilación de los receptores, se produce la activación de diversas cascadas de señalización que permiten en último término el control de la plasticidad sináptica, la supervivencia neuronal, el crecimiento de las neuritas y el aumento de la expresión de BDNF. La formación de los dímeros TrkB-FI / TrkB-T impide la transducción de la señal dependiente de la unión del ligando. (b) Los astrocitos únicamente expresan el receptor TrkB-T1, el cuál es capaz de dimerizar en presencia de la neurotrofina correspondiente, lo que origina el aumento de los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  y la inhibición de la proteína RhoA. MAPK, *mitogen activated protein kinase*; RSK, *ribosomal S6 kinase*; PLCγ, *phospholipase C gamma*; DAG, *diacylglycerol*; PKC, *protein kinase C*; MEK, *MAPK/ERK kinase*; CREB, *cAMP/ $Ca^{2+}$  response element-binding protein*; IP3, *inositol-1, 4, 5-triphosphate*;  $Ca^{2+}$ , calcio; LTP, *long term potentiation*; PI3K, *phosphatidylinositol-3-kinase*; Gprot, *G protein*; RhoGDI, *Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor 1*.

embargo, una estimulación prolongada produce la desensibilización del propio receptor (Carter et al., 1995); (Frank et al., 1996); (Haapasalo et al., 2002), e incluso puede inducir necrosis neuronal *in vitro* (Kim et al., 2003). La localización de la interacción ligando-receptor también determina las rutas de señalización que son activadas. La estimulación axonal produce la activación de

la ruta Ras-MAPK, lo que contribuye a la elongación de los axones (Mason et al., 2000); (Kuruvilla et al., 2000). Por el contrario, la fosforilación de los receptores Trk localizados en el cuerpo celular promueve la activación de cascadas de señalización que median la supervivencia neuronal (Bhattacharyya et al., 1997); (Riccio et al., 1997); (Tsui-Pierchala and Ginty, 1999); (Watson et al., 1999).

Tabla2

Fenotipos de ratones mutantes para TrkB*trkB-FI<sup>-/-</sup> trkB-T1<sup>+/-</sup>*

- Reducción de neuronas de los ganglios sensoriales y motoneuronas de la médula espinal.
- Aumento del número de neuronas apoptóticas en el giro dentado.

*trkB-FI<sup>+/+</sup>*

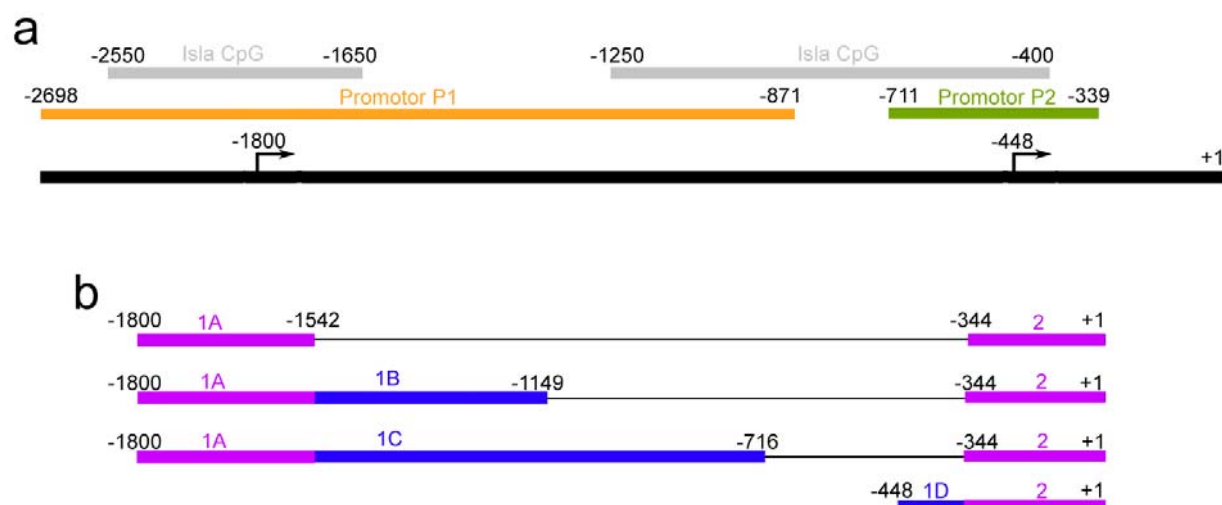
- Aumento de la memoria y capacidad de aprendizaje.
- Reducción de la ansiedad.

*trkB-T1<sup>+/+</sup>*

- Reducción de la memoria y capacidad de aprendizaje.
- Incremento de la susceptibilidad al daño producido por isquemia.

Además, como indicamos anteriormente, la señalización de TrkB-FI en neuronas puede ser suprimida por la formación de heterodímeros TrkB-FI / TrkB-T1 (Eide et al., 1996); (Haapasalo et al., 2001), lo que ocasiona la pérdida de las señales de supervivencia dependientes de BDNF (Saarelainen et al., 2000); (Dorsey et al., 2002); (Saarelainen et al., 2003); (Dorsey et al., 2006). La generación de ratones genéticamente modificados que carecían o tenían alterada la expresión de las distintas isoformas de TrkB, proporcionó información adicional sobre los efectos producidos por la activación del receptor TrkB (Tabla 2). Los primeros ratones *trkB<sup>-/-</sup>* se generaron al interrumpir la fase de lectura del exón codificante para el dominio citoplásmico tirosina kinasa, lo que suprimía por completo la expresión de la isoforma TrkB-FI, mientras que la expresión de los receptores truncados

sólo se redujo en un 50% (Klein et al., 1993). Estos ratones homocigóticos se desarrollaban hasta el nacimiento, pero morían a los pocos días por inanición. Presentaban una dramática reducción del número de neuronas de los ganglios sensoriales y una pérdida muy significativa de motoneuronas en la médula espinal (Klein et al., 1993). En los pocos ratones que sobrevivieron durante tres semanas, se observó un aumento del número de neuronas apoptóticas, especialmente en el giro dentado (Alcantara et al., 1997). Posteriormente se desarrollaron ratones en los que además se suprimió la expresión de las isoformas truncadas de TrkB. En éstos, la supervivencia de las neuronas sensoriales estaba aumentada respecto a los ratones *trkB-FI<sup>-/-</sup>*, indicando un efecto proapoptótico del receptor TrkB-T (Luikart et al., 2003) (Tabla 2). Existen diversos estudios con ratones que sobreexpresan las distintas isoformas de TrkB. Los que tienen mayor expresión de TrkB-FI presentan incrementadas la memoria y la capacidad de aprendizaje, así como una disminución en los niveles de ansiedad (Lahtinen et al., 2003); (Koponen et al., 2004a; Koponen et al., 2004b). Por el contrario, los ratones que sobre-expresan la isoforma TrkB-T1 (Tabla 2) tienen disminuida la capacidad de aprendizaje y memoria, y presentan una mayor susceptibilidad al daño producido en la isquemia (Saarelainen et al., 2000). Estos



**Figura 6. Estructura de la región 5' terminal del gen *trkB* en ratón.** (a) La localización de las regiones promotoras queda indicada por las cajas de colores, mientras que las cajas en gris señalan la localización de las islas CpG. Las flechas marcan los dos sitios de inicio de la transcripción. Los números indican la posición en pares de bases respecto al sitio de inicio de la traducción. (b) Representación esquemática de los transcritos originados a partir de la región 5' UTR del gen *trkB* de ratón. Las cajas en violeta marcan las regiones exónicas y las cajas en azul los exones alternativos. Los números indican la posición en pares de bases respecto al codón de inicio de la traducción.

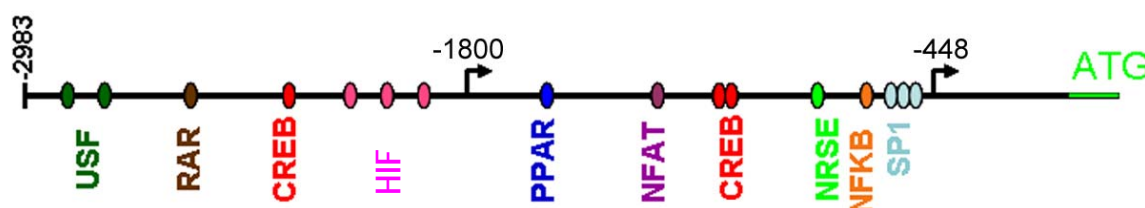
ratones alcanzaban unas 20 veces los niveles del ARNm de TrkB-T1 de los ratones normales lo que producía, al quedar unido el ligando a los receptores homodiméricos TrkB-T1 / TrkB-T1, una reducción de la activación del receptor TrkB-FI (Saarelainen et al., 2003), posiblemente. Además, estos ratones no responden a los antidepresivos, lo que sugiere que la señalización dependiente de TrkB-FI es necesaria para la acción de estas drogas (Saarelainen et al., 2003). Otro modelo de ratones que sobreexpresan TrkB-T1 es el de la trisomía del cromosoma 16 (Ts16). Estos animales presentan un alto grado de apoptosis en neuronas de la corteza cerebral y el hipocampo que no puede ser disminuida por inyección de BDNF, indicando así que en

estos ratones se produce un aumento de la muerte celular como consecuencia de la supresión de las vías de supervivencia dependientes de TrkB-FI (Dorsey et al., 2002); (Dorsey et al., 2006; Renn et al., 2006).

#### 1.2.4 Regulación de la expresión de *TrkB*.

La caracterización de la secuencia del gen *trkB* de ratón previa al sitio de inicio de la traducción reveló que esta región confiere especificidad de expresión en tejidos, y que en ella se localizan dos promotores alternativos denominados P1 y P2 (Fig. 6a). El hecho de que ambas regiones promotoras se localicen





**Figura 7. Representación de los diferentes elementos putativos de respuesta localizados en la región 5' terminal del gen *trkB* de ratón.** El análisis *in silico* de la región 5' terminal del gen *trkB* de ratón reveló la presencia de distintos sitios putativos de unión de factores de transcripción. Entre ellos se encuentra: USF, *upstream stimulatory factor*; RAR, *retinoic acid receptor*; CREB, *cAMP/Ca<sup>2+</sup> response element-binding protein*; HIF, *hypoxia inducible factor*; NFAT, *nuclear transcriptional factor in activated T cells*; NRSE, *neuronal response silencing element-binding protein*. Los sitios de inicio de la transcripción de los promotores P1 y P2 se localizan en las posiciones -1800 y -448 respectivamente.

dentro de zonas ricas en el dinucleótido CpG (islas CpG) y que el gen carezca de elementos iniciadores como la caja TATA, así como la presencia de 2 inicios de transcripción le confieren características de un gen *housekeeping*. Además, parte del promotor P2 se encuentra localizado dentro de un intrón de los transcritos producidos a partir del promotor P1 (Fig. 6b), lo que genera varios ARNm que codifican para la misma proteína pero contienen diferentes regiones 5' UTR generadas por procesamiento alternativo (Barettino et al., 1999). En humanos, esta región contiene los 5 primeros exones y presenta, al menos, 9 sitios de inicio de la transcripción diferentes (Stoilov, 2002). Así, el procesamiento alternativo tanto de la región 5'UTR como de la región codificante, puede producir hasta 100 transcritos distintos que codifican para 10 isoformas diferentes del receptor TrkB. El estudio *in silico* de la región del gen *trkB* de ratón donde se localizan los

promotores P1 y P2, reveló la presencia de posibles elementos de regulación de distinta naturaleza (Fig. 7). Entre éstos se encuentran sitios de unión para el factor de transcripción SP-1, el factor NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor kappa B*), el receptor RAR (Receptor de ácido retinoico), el receptor PPAR (Receptor activador de la producción de peroxisomas), el factor HIF (Factor inducido por hipoxia) y el factor CREB. La presencia de posibles elementos de unión de CREB abre la posibilidad de que, al igual que ocurre con el gen *bdnf*, el gen *trkB* pueda estar regulado por múltiples señales adaptativas de las cuales CREB es partícipe. La actividad neuronal es capaz de inducir, tanto por depolarización como por aumento del segundo mensajero AMPc, un incremento de los niveles proteicos de TrkB en las dendritas, axones y cuerpo celular (Tongiorgi et al., 1997); (Meyer-Franke et al., 1998). También se promueve un aumento de los niveles de ARNm y proteína

de TrkB por estimulación eléctrica que induce el potencial de acción y la LTP (Du et al., 2003), actividad prolongada del aparato locomotor (Gomez-Pinilla et al., 2002) y los ritmos circadianos (Dolci et al., 2003), así como por daño cerebral, ataques epilépticos, hipoglucemia e isquemia (Kokaia et al., 1993); (Arai et al., 1996); (Lindvall et al., 1994); (Merlio et al., 1993); (Salin et al., 1995). Muchos de estos estímulos también inducen la expresión de BDNF, tanto a nivel de ARNm como de proteína. El gen *bdnf* usa 4 promotores alternativos, que dan lugar a 8 tipos diferentes de transcritos, todos ellos codificantes para la misma proteína. Se desconoce el porqué se produce tal número de ARNm que codifican para BDNF, pero una de las hipótesis más aceptadas es que la existencia de múltiples promotores y transcritos permite una regulación de la expresión de este factor a varios niveles, incluyendo la transcripción, la traducción, la estabilidad de los ARNm y la localización subcelular (Zafra et al., 1990); (Timmusk et al., 1993); (Metsis et al., 1993); (Timmusk et al., 1994); (Tao et al., 1998). Diferentes estudios han mostrado que el aumento de los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ , debido a la depolarización o a la activación de los receptores de glutamato NMDAR (*N-methyl-D-aspartate receptor*), induce un incremento de los niveles del ARNm de BDNF debido a un aumento de la transcripción de dicho gen.

Se determinó que la activación de CREB era fundamental y que su efecto estaba mediado a través de un elemento CRE (*cAMP/Ca<sup>2+</sup> response element*) localizado en la región anterior al promotor 3 (Zafra et al., 1990); (Ghosh et al., 1994); (Tao et al., 1998); (Kornhauser et al., 2002); (Hardingham et al., 2002). El hecho de que se produzca la defosforilación de CREB como consecuencia de la sobre-estimulación de los receptores de glutamato tipo NMDA, y en consecuencia la pérdida de la transcripción del gen *bdnf* y las señales dependientes de esta neurotrofina (Hardingham et al., 2002); (Lee et al., 2005), sugiere que puede existir una regulación similar del gen *trkB*. También se ha descrito cierta correlación entre la regulación de TrkB y diversas enfermedades neurodegenerativas. Así, el grupo de E. Marti (Ferrer et al., 1999) describió una reducción de los niveles de BDNF y TrkB-F1, pero un aumento de TrkB-T1 en neuronas individuales y la glia reactiva en cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer. A pesar de la multitud de estímulos capaces de producir la regulación de *trkB*, poco se conoce sobre los mecanismos moleculares que controlan su expresión. Éste constituye el objetivo principal de la presente tesis.

## **2. Objetivos**

En la hipótesis de este trabajo, proponemos la existencia de diversos mecanismos moleculares que controlan la expresión del receptor de neurotrofinas TrkB en células del SNC, los cuales dependerían de la modificación de los niveles citoplásmicos de AMPc y  $\text{Ca}^{2+}$ . La descripción de estos mecanismos pondría de manifiesto la importancia de la regulación de la expresión de TrkB en diferentes situaciones adaptativas en las cuales participa. En este contexto nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar el efecto que tendría sobre la expresión de TrkB el tratamiento de cultivos primarios de astrocitos y neuronas corticales con la droga Forskolina (Fk), para aumentar el AMPc citoplásmico, o con ATP en astrocitos para aumentar el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

2. Analizar la implicación de las diferentes rutas de señalización dependientes de AMPc y  $\text{Ca}^{2+}$  en esa regulación.

3. Caracterizar los elementos de respuesta presentes en la región terminal del gen *trkB* implicados en la regulación dependiente de esos estímulos.

4. Estudiar el efecto que tendría sobre los niveles de TrkB el tratamiento cultivos primarios de neuronas corticales con el

análogo de glutamato NMDA, a concentraciones excitotóxicas.

5. Evaluar la posible participación de TrkB en la muerte neuronal dependiente de excitotoxicidad.

### **3. Materiales y métodos**

### 3.1 Cultivos celulares.

#### 3.1.1 Cultivos primarios de neuronas corticales.

Los cultivos primarios de neuronas corticales se prepararon a partir de embriones de rata tipo Wistar de 18 a 19 días de gestación (E18/E19). Las cortezas cerebrales de los fetos fueron obtenidas en condiciones de asepsia. Una vez retiradas las meninges, las cortezas se disgregaron mecánicamente en 1ml de medio MEM (*minimum essential medium*) (Invitrogen) suplementado con 16µg/ml de gentamicina, 2mM de glutamina, 0,6% de glucosa, 10% de suero bovino fetal (FBS; *foetal bovine serum*), y 10% de suero de caballo (HS; *horse serum*). Tras la disgregación, las células se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^7$  células/placa de 100mm de diámetro tratadas previamente con poli-L-lisina (10µg/ml, Sigma) y Laminina (4µg/ml, Sigma), y fueron mantenidas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Dos horas después de la siembra, se colocaron dos cubreobjetos de cristal sobre los cultivos, de manera que las células quedasen entre ellos y el fondo de la placa y así minimizar el crecimiento de células gliales (Brewer and Cotman, 1989). Bajo estas condiciones, en las que la mayoría de las células tras 5 días de cultivo (5DIV; *days in vitro*) son neuronas, los cultivos

fueron tratados con Forskolina (30µM), DMSO (30µM) o el análogo no hidrolizable del AMPc 8-Br-cAMP (2mM). Para los ensayos de neurotoxicidad *in vitro*, las neuronas se obtuvieron como anteriormente pero se cultivaron en medio MEM (Invitrogen. N° Catálogo: 21090-022) suplementado con HS 5%, FBS 5%, glucosa 22.2mM, glutamina 0.1mM y gentamicina 16µg/ml, a una densidad de  $2.5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en placas tratadas como anteriormente. Se añadió citosina-β-D-arabinofuranosido (10µM) a día de cultivo 7 para minimizar el crecimiento de células gliales. El tratamiento experimental para la activación de los receptores de glutamato de tipo NMDA se realizó después de 14DIV. Las concentraciones de cada uno de los reactivos utilizados fueron: NMDA 100µM; Glicina 10µM; APV 100µM; Ifenprodil 10µM. La activación excitotóxica de los receptores de glutamato tipo NMDA se produjo mediante la adición al medio de cultivo de los coagonistas NMDA y glicina.

#### 3.1.2 Cultivos primarios de astrocitos corticales.

Para la obtención de los cultivos primarios de astrocitos corticales, seguimos el protocolo descrito por (Renau-Piqueras et al., 1989). Estos fueron mantenidos en crecimiento a

37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad, en medio de cultivo DMEM (Invitrogen. N° Cat. 419666-029), suplementado con FBS 20% y gentamicina 16µg/ml, durante las primeras 48h, remplazándolo por medio fresco transcurridos 2DIV. A los 4 días en cultivo se disminuyó el FBS a un 10%, realizando cambios totales de medio cada 3 días hasta su utilización.

### 3.1.3 Cultivo de células Neuro2a-cerbA.

Las células Neuro2-cerbA (N2a-cerbA) se obtuvieron por infección retroviral de la línea parental (N2a) con retrovirus que conducen a la expresión del receptor alfa-1 de la hormona tiroidea (c-erbA). A diferencia de la línea parental, estas células expresan el receptor TrkB-FI, (Pastor et al., 1994). Las células N2a-cerbA se mantuvieron en DMEM suplementado con FBS al 10%, glutamina 2mM, penicilina 50U/ml y estreptomycin 50µg/ml. El día anterior a realizar los ensayos de transfección, se sembraron a una densidad de 0,25x10<sup>6</sup> células/placa de 35mm de diámetro.

## 3.2 Análisis de los ARN mensajeros.

### 3.2.1 Obtención y preparación del ARN total.

El ARN total se extrajo empleando el reactivo “*TriReagent*” (Sigma) de acuerdo a las condiciones establecidas por el fabricante. Todas las muestras de ARN fueron tratadas con ADNasaI libre de ARNasa (10U, Promega) para eliminar cualquier resto de ADN genómico. El ARN así obtenido fue cuantificado espectrofotométricamente y su integridad comprobada por electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE.

### 3.2.2 Ensayos de protección frente a ARNasas (RPA; Ribonuclease protection assay).

La secuencia de 391bp obtenida de la digestión del ADNc de TrkB (Middlemas et al., 1991) con HincII y ScaI, fue clonada en el vector pBKS (Lindfors et al., 1995) para sintetizar una ribosonda que protege un fragmento de 391bp del ARNm de TrkB-FI, y 238bp del ARNm de TrkB-TI. Para la síntesis de la ribosonda utilizamos el kit “*MAXIscript*” (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante, en presencia de [<sup>32</sup>P-α]-CTP. Como control en los experimentos utilizamos un ribosonda capaz de proteger un fragmento de 161bp de la secuencia de ARNm del gen *gapdh* de rata (nucleótidos 196 al 357). Los ensayos de RPA se realizaron empleando el kit “*RPAIL - Ribonuclease Protection Assay Kit*” (Ambion). En cada reacción, 20µg de ARN total extraído de neuronas o astrocitos

corticales fueron hibridados con las ribosondas de TrkB y GAPDH siguiendo las recomendaciones del proveedor. Los fragmentos protegidos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% en tampón TBE. Tras la electroforesis, los geles fueron secados y expuestos a películas de Rayos-X a  $-70^{\circ}\text{C}$ . La cuantificación densitométrica de las bandas obtenidas en las autoradiografías fue realizada utilizando el programa de análisis *NIH Image*. Para cada ensayo, los valores obtenidos en la cuantificación de los fragmentos protegidos para los transcritos de TrkB-FI y TrkB-T1 se normalizaron respecto a los resultados obtenidos para la ribosonda de GAPDH.

### 3.2.3 Ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (*qRT-PCR*; *quantitative Real Time-PCR*).

Para la síntesis de ADNc se utilizaron 2 $\mu\text{g}$  de ARN total, oligo-dT 0.5 $\mu\text{M}$  (Promega) y MMLV 200U (Promega) en un volumen final de 20 $\mu\text{l}$ , según las instrucciones del fabricante. La reacción de *qRT-PCR* se realizó en un volumen final de 20 $\mu\text{l}$  conteniendo ADNc 0.5 $\mu\text{l}$ , Taq Polimerasa 0.05U (Biotools), dNTPs 0.2mM, oligonucleótidos específicos 0.2 $\mu\text{M}$ , SybrGreen 1:40000 y  $\text{MgCl}_2$  3mM. Después de un ciclo inicial de 3min a  $94^{\circ}\text{C}$ , se realizaron 35 ciclos con los siguientes pasos: 20s a  $94^{\circ}\text{C}$ , 20s a  $60^{\circ}\text{C}$ , 20s a

$72^{\circ}\text{C}$  y 15s a  $85^{\circ}\text{C}$ . Como control de carga utilizamos oligonucleótidos que hibridaban con el ADNc de GAPDH: 5'-TTG CCA TCA ACG ACC CCT TC-3' y 5'-GCC TTG ACT GTG CCG TTG AA-3'. Los oligonucleótidos específicos para detectar los niveles de los transcritos de TrkB-T1 fueron 5'-GGG GCT GTG CTG CTT GGT- 3' y 5'-GCT GCG GAC ATC TTT GGA GA-3', mientras que los específicos para TrkB-FI fueron 5' CTG GAC AGC ACG TCC AAC AT 3' y 5' GAG AGA CTT GAC CTG AGC AC 3'. Los niveles de cada transcrito se normalizaron a los de GAPDH acorde a la ecuación  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ .

## 3.3 Análisis proteico.

### 3.3.1 Ensayos de Western Blot (WB).

Para los ensayos de WB se recogieron las células en PBS frío y se lisaron en hielo durante 30min en tampón de lisis (Tris-HCl 50mM pH 8.0, NaCl 150mM, Triton X-100 1%, DTT 1mM), conteniendo los inhibidores de proteasas “*Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets*” (Roche). Los sobrenadantes se recogieron tras sedimentación por centrifugación (30min, 12000g) de los restos celulares insolubles. La concentración de proteína en los extractos se determinó mediante el ensayo “*BCA Protein Assay*” (Pierce). Cantidades equivalentes de proteína



total fueron separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida del 6% al 8%, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), seguido de transferencia a membranas de nitrocelulosa (GE Biosciences). Los anticuerpos primarios y las diluciones utilizadas fueron: anti-pan-TrkB (Santa Cruz Biotechnology, H-181) 1:500, anti-TrkB-T1 (Santa Cruz Biotechnology) 1:200, anti-pan-P-Trk (Tyr490; Cell Signaling Technologies) 1:1000, anti-P-CREB (Upstate) 1:1000, anti- $\beta$ -actina (Sigma) 1:5000 y anti-Tuj-1 ( $\beta$ -III-Tubulina) (Covance) 1:40000. Los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (*HRP*; *horseradish peroxidase*) (Santa Cruz Biotechnology) se utilizaron a una dilución 1:5000. Los ensayos de WB se resolvieron por quimioluminiscencia con los reactivos ECL, o ECL-Plus (GE Biosciences). La cuantificación densitométrica de las bandas de inmunoreactividad fue realizada con el programa *NIH Image*.

### 3.3.2 Ensayos de Inmunocitoquímica.

Los cultivos primarios se crecieron en cubreobjetos circulares de 12mm de diámetro. Para las neuronas, éstos fueron tratados previamente con poli-L-lisina (10 $\mu$ g/ml, Sigma) y Laminina (4 $\mu$ g/ml, Sigma) durante toda la noche a 37°C. Los cultivos, estimulados o no con las diferentes drogas, se

lavarón con PBS y se fijaron durante 30min con una solución de paraformaldehído al 4% (p/v) en PBS. Posteriormente, se lavaron nuevamente en PBS y se permeabilizaron por inmersión durante 2min en metanol a -20°C. A continuación, se incubaron durante 30min a temperatura ambiente en una solución de bloqueo compuesta por HS al 10% (v/v), y Triton X-100 al 0.1% (v/v) en PBS. La incubación con los anticuerpos primarios se hizo en la misma solución de bloqueo a las siguientes concentraciones: anti-P-CREB (Upstate) 1:200, anti- $\beta$ -actina (Sigma) 1:500, anti-pan-TrkB (Santa Cruz Biotechnology) 1:200, anti-Tuj-1 ( $\beta$ -III-tubulina) (Covance) 1:1000 y anti-GFAP (Cell Signaling) 1:2000. Tras varios lavados con PBS se procedió a la incubación con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor 568 o Alexa Fluor 594 (Molecular Probes. Invitrogen). El ADN nuclear se tiñó con DAPI 1 $\mu$ g/ml (Sigma) o To-PRO3 2 $\mu$ M (Molecular Probes. Invitrogen), añadidos a la solución de los anticuerpos secundarios. Finalmente, los cubreobjetos se montaron en solución Fluoromount-G (SouthernBiotech) para ser analizadas mediante microscopía óptica de fluorescencia o microscopía confocal.

### 3.4 Generación de Plásmidos y lentivirus.

Los vectores reporteros -1600P2-Cat, -870P2-Cat, -5100P1-Cat y -2700P1-Cat se generaron al subclonar en el vector pBLCAT3 los fragmentos que contenían la secuencia del promotor del gen *trkB*, obtenidos a partir del vector pSJ54, cedido generosamente por el Profesor M. Barbacid (CNIO, Madrid). Los dos primeros vectores incluyen desde los nucleótidos -1606 ó -871 al -325, y los dos segundos desde el nucleótido -5130 ó -2698 hasta el -871. El vector reportero -1600P2-Luc, equivalente al -1600P2-Cat, contenía el fragmento -1606 a -325 del promotor de *trkB* en el vector “*pGL3-basic vector*” (Promega Madison, WI). El vector -1600ΔCREsP2-Luc se generó por mutagénesis dirigida mediante PCR utilizando los oligonucleótidos: 5'-GCC CCT GCT AGA TCT TCG CCA GCA GTA GCA GAG GC-3' y 5'-CTG CTG GCG AAG ATC TAG CAG GGG CAG AAA CTC CAG AA-3'. Los vectores de expresión de PKA y mPKA (Maurer, 1989), así como el inhibidor termoestable de PKA (PKI) y una forma mutante (mPKI) (Day et al., 1989); (Howard et al., 1991), fueron proporcionados amablemente por el Dr. R. A. Maurer (Oregon Health Science University, Portland, USA). Los vectores de expresión de las isoformas dominantes negativas de CREB, K-CREB (Walton et al., 1992) y A-CREB (Ahn et al., 1998), fueron proporcionados por el Dr. R.H. Goodman (Oregon Health Science University, USA) y el Dr. C. Vinson (The

Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA), respectivamente. El plásmido lentiviral pLenLox-Syn-Syn-EGFP fue usado como vector para el subclonaje de los receptores TrkB-Fl y TrkB-T1 y para la producción de virus. Este plásmido contiene dos promotores neuroespecíficos del gen *sinapsina*. El primer promotor dirige la síntesis de una proteína de interés, mientras que el segundo controla la expresión de la proteína EGFP de manera independiente al primer promotor. El lentivirus LV-Syn-DsRED-Syn-EGFP, utilizado como control, permite la expresión simultánea en las células infectadas de las proteínas fluorescentes DsRED y EGFP. Ambos virus fueron generados por S. Gascón en un proyecto de la Dra. M. Díaz-Guerra en colaboración con los Drs. P. Scheiffele (Universidad de Columbia, Nueva York) y F. G. Scholl (Universidad de Sevilla) (Gascón, 2007). El plásmido pLenLox-Syn-HA-TrkB-Fl-Syn-EGFP fue generado por subclonaje en las dianas BamHI y NotI del vector lentiviral, de la secuencia codificante del receptor TrkB-Fl fusionada al epítipo HA, obtenida a partir del vector pRC-CMV-HA-TrkB-Fl, cedido generosamente por el Profesor Y. A. Barde (Biozentrum, Basel, CH). El plásmido pLenLox-Syn-TrkB-T1-Syn-EGFP fue generado por subclonaje en las dianas BamHI y XhoI del vector lentiviral, de la secuencia codificante de TrkB-T1 obtenida a partir del vector pFRk42, cedido

generosamente por el Profesor M. Barbacid (CNIO. Madrid). Los virus recombinantes se produjeron por transfección en células HEK293T del vector lentiviral correspondiente y de los vectores de empaquetamiento pCAG-VSVG, plásmido codificante de la proteína de la cápsida viral VSVG (glicoproteína g del virus de la estomatitis vesicular), y el vector pCMV-ΔR8.91 que contiene los genes Gag/Pol, Tat y Rev del HIV-1. Los medios de cultivo conteniendo las partículas víricas, se recogieron a las 48h-60h después de la transfección acorde al protocolo establecido en (Lois et al., 2002), y se concentraron usando columnas de filtración para pesos moleculares de 100 kDa (Centricon Plus-20; Millipore). El título viral se determinó por infección de células PC12 con diluciones seriadas de las suspensiones víricas. La eficiencia de la transducción se determinó por medición en FACSscan de la fluorescencia de la proteína EGFP expresada en los cultivos. Se definió la Unidad de Infección Relativa (U.I.R) como la cantidad mínima de solución vírica capaz de infectar el 100% de las células en los cultivos.

### 3.5 Transfecciones e infecciones.

Las células N2a-*cerbA* se transfectaron mediante el método clásico del fosfato cálcico

(Maniatis et al., 1982). Transcurridas 16h, se cambió el medio por medio fresco y se añadió Fk 30μM o solvente (DMSO) durante 6h. A continuación se analizaron las actividades luciferasa, CAT, β-galactosidasa y Renilla mediante los procedimientos estándar. Los cultivos primarios de neuronas corticales, crecidas en placas de 24 pocillos a una densidad de  $2,5 \times 10^5$  células/pocillo, fueron transfectadas tras 5DIV, mientras que los cultivos de astrocitos, crecidos en el mismo tipo de placa a una densidad de 1/40 corteza cerebral/pocillo, lo fueron a 7DIV. Transcurridas 48h desde la transfección con Lipofectamina 2000 (Invitrogen), se analizaron las actividades CAT y β-galactosidasa por procedimientos estándar, y las actividades luciferasa y Renilla empleando el kit “*Dual-Glo Luciferase Assay System*” (Promega). Los cultivos primarios de neuronas corticales se infectaron mediante la adición al medio de crecimiento de la suspensión viral, normalmente a 7DIV. Los tratamientos con NMDA y glicina, cuando se requirieron, se realizaron 7 días después de la infección.

### 3.6 Ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA).

#### 3.6.1 Extractos proteicos nucleares.

Las células, una vez estimuladas, se recogieron en tampón PBS frío (4°C) y posteriormente se centrifugaron a 4000g durante 3min a 4°C. Los sedimentos se resuspendieron en tampón HypoB (Tris-HCl 10mM pH 7.4, KCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, PMSF 0.5mM, DTT 1mM, y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM). Tras 10min de incubación en hielo, los núcleos se recogieron por centrifugación a 12000g durante 3min a 4°C. Se procedió a su lisis mediante resuspensión en 20µl de tampón LS a 4°C (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, glycerol 29%, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, KCl 0.7M, PMSF 0.5 mM, DTT 1 mM y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM) e incubación en hielo durante 30min. Los restos celulares se retiraron mediante centrifugación a 12000g durante 30min a 4°C. Los sobrenadantes, cuya concentración proteica fue determinada mediante el ensayo de BCA, fueron alicuotados y congelados a -80°C hasta su utilización.

### 3.6.2 Unión *in vitro* a DNA y análisis.

Los oligonucleótidos complementarios de cadena sencilla se anillaron y marcaron en sus extremos con el enzima T4 Polinucleótido Kinasa en presencia de [<sup>32</sup>P-γ]-ATP (3000 Ci/mmol). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos son: (E) 5'TGC ACT GCG TCA GCC CTC ACG TCA C3', (M1) 5'TGC ACC GTA GTA

GCC CTC ACG TCA C3', (M2) 5'TGC ACT GCG TCA GCC CTA CTA GTA C3', (M3) 5'TGC ACC GTA GTA GCC CTA CTA GTA C3'. Los extractos nucleares (10µg de proteína /muestra) se añadieron a 4°C al tampón de unión (glicerol 10%, MgCl<sub>2</sub> 5mM, KCl 100mM, HEPES 20mM pH 7.9, DTT 5mM, Triton-X-100 0,1%, poli(dI-dC) 0,3 mg/ml y 5µg de albúmina sérica bovina). La reacción de unión se inició añadiendo a las proteínas nucleares 2µl del tampón de unión conteniendo 5x10<sup>4</sup>cpm de los oligonucleótidos marcados, manteniéndose durante 20min a temperatura ambiente. En su caso, los anticuerpos para los factores de transcripción o los oligonucleótidos de doble cadena sin marcar, fueron añadidos al tampón de unión 30min antes de la adición de los extractos proteicos y de los oligonucleótidos marcados. Los anticuerpos utilizados fueron: anti-CREB (New England Biolabs), anti-ATF-1 y anti-p53 (Santa Cruz Biotechnology). Las interacciones se analizaron en geles de acrilamida al 6% en tampón TBS. Después de la electroforesis, los geles se secaron y expusieron a películas de Rayos-X empleando pantallas intensificadoras.

### 3.7 Ensayos de viabilidad y muerte neuronal *in vitro*.

El ensayo de MTT se basa en la capacidad de las enzimas deshidrogenasas presentes en la mitocondria de reducir la sal de tetrazolio MTT, soluble en agua, para generar una sal de formazano insoluble en agua. Puesto que las sales formadas tienen la capacidad de absorber luz a una longitud de onda de 570nm, es posible determinar su cantidad por procedimientos colorimétricos, y determinar así la viabilidad del cultivo celular. Para ello, añadimos 0.5mg/ml de MTT al medio de cultivo tras la estimulación y transcurridas 2h se procedió a la solubilización del compuesto de formazano con DMSO para ser cuantificado espectrofotométricamente a 570nm. Puesto que los cultivos primarios utilizados presentan tanto neuronas como células de la glia, se estableció la contribución a la viabilidad de las células no neuronales exponiendo cultivos paralelos a 400μM de NMDA durante 24h, lo que inducía la muerte de todas las neuronas pero no de las células de la glia (Choi et al., 1988). El valor obtenido fue entonces sustraído de todas las medidas realizadas. El ensayo del enzima lactato deshidrogenasa (LDH) permite cuantificar colorimétricamente la lisis celular, al medir la actividad de este enzima que se libera al medio de cultivo desde las células que han perdido la integridad de la membrana plasmática. Su actividad se determina por una reacción enzimática acoplada, donde la sal de tetrazolio INT es reducida a la sal de

formazano insoluble en agua. Los ensayos de medición de la actividad LDH se realizaron empleando el kit “*Cytotoxicity Detection Kit – LDH*” (Roche) acorde a las instrucciones del fabricante.

### 3.8 Estudios *in vivo*.

#### 3.8.1 *Modelo animal de isquemia cerebral focal.*

Para la realización de este estudio se utilizaron ratas macho adultas Sprague-Dawley (250g-325g), criadas en el animalario del Hospital Universitario La Paz, con nº de registro 280790001941. Todos los animales y procedimientos realizados cumplieron la legislación vigente (R.D. 1201/2005 de 10 de Octubre; Directiva de 86/609/CEE de la Comisión Europea). Los experimentos fueron aprobados por la Comisión de Bioética del CSIC. El modelo de isquemia cerebral focal utilizado y las inmunohistoquímicas los realizó la Dra. M. Sobrado gracias a una estrecha colaboración establecida con la Unidad de Investigación Cerebrovascular del Hospital Universitario La Paz, dirigida por el Dr. J. M. Roda. Las ratas se anestesiaron por inyección intraperitoneal con una solución de diazepam (5mg/Kg), hidrocloreto de ketamina (Ketolar, 62.5mg/Kg) y atropina (0.25mg/Kg). La arteria femoral se canuló con

un catéter de polietileno (SILASTIC<sup>®</sup>, Medical Grade Tubing, Down Corning) para la monitorización continua de la presión sanguínea arterial (monitor de constantes Schiller type CM8), y la toma de muestras de sangre para el análisis de gases, pH y glucosa (Arkray). Las medidas de estos parámetros se realizaron antes de la oclusión, 15min después de ella y a los 10min de iniciada la reperfusión. Durante la cirugía, y hasta la recuperación de la anestesia, la temperatura corporal se mantuvo a  $36\pm0.5^{\circ}\text{C}$  usando una plataforma servocontrolada emisora de calor sobre la que se colocó al animal y una sonda de temperatura rectal (Termorregulador Cibertec RTC-1). Se midió la temperatura cerebral con un sensor de temperatura colocado bajo el músculo temporal y sobre la región de la arteria cerebral media (ACM). Ésta se mantuvo a  $36\pm0.5^{\circ}\text{C}$  por medio de una lámpara situada sobre la cabeza. El procedimiento quirúrgico fue una variante del descrito por (Chen et al., 1986) y (Liu et al., 1989). Se realizó una pequeña craniectomía a nivel del tronco de la ACM derecha y sobre la fisura rinal. La ACM se ligó transitoriamente, a nivel del tronco de ésta justo antes de su bifurcación en las ramas frontal y parietal, con una sutura monofilamento de 9/0 (Nylon, S&T). Entonces, se ocluyeron también ambas arterias carótidas comunes mediante la ligadura con una seda de 6/0 (Mersilk, Ethicon), y las tres arterias se mantuvieron

ocluidas durante 60min. A continuación, se procedió a la liberación de las tres suturas para permitir la reperfusión sanguínea durante 6h y 24h después de la oclusión. La interrupción por completo del flujo sanguíneo a través de la ACM y la posterior recirculación del vaso se confirmó bajo el microscopio quirúrgico (Wild M650).

### 3.8.2 Ensayos de Inmunohistoquímica.

Terminado el período de reperfusión correspondiente (6h y 24h), las ratas se perfundieron por vía intracardiaca con una solución de paraformaldehído al 4% (p/v) en tampón PBS a  $4^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se extrajeron los cerebros y se mantuvieron en la misma solución de fijación a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24h. Los cerebros se sumergieron entonces durante al menos 6h en concentraciones crecientes de sacarosa (10%, 15%, y 20%) preparada en PBS antes de su criocongelación. Para los ensayos de inmunohistoquímica, se prepararon secciones coronales de  $30\mu\text{m}$  de grosor en un criostato (Leica, Heidelberg, Alemania). Las secciones obtenidas se permeabilizaron y bloquearon con 10% (v/v) de suero de oveja y 0.4% (v/v) de Triton X-100 en TBS, durante 3h a temperatura ambiente. Los anticuerpos se diluyeron en TBS con 4 % (v/v) de suero de oveja y 0.2% (v/v) de Triton X-100. Las secciones se

incubaron con los anticuerpos primarios anti-TrkB-T1 (1:100) (Santa Cruz Biotechnology) y anti-GFAP (1:200) (Cell Signaling), toda la noche a 4°C. Después de varios lavados, incubamos las secciones durante 2h con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con Alexa Fluor 568 o Alexa Fluor 594 (Molecular Probes. Invitrogen), todos ellos diluidos 1:200. Finalmente, las secciones se tiñeron durante 30min con To-PRO3 2µM (Molecular Probes. Invitrogen) y se montaron con solución Fluoromount-G (SouthernBiotech), para su posterior análisis utilizando un microscopio confocal Radiance 2000 (Bio-Rad) acoplado a un microscopio invertido Axiovert S100 TV (Zeiss) y a un objetivo de inmersión Plan-Apochromat de 40 aumentos. Como controles negativos de la reacción inmunohistoquímica, algunas muestras se procesaron simultáneamente y se incubaron sin el anticuerpo primario. Secciones adyacentes se tiñeron con violeta de cresilo para identificar el área cortical dañada.

## **4. Resultados**



#### 4.1. Estudio de la regulación de la expresión del receptor de neurotrofinas TrkB en cultivos primarios de astrocitos corticales.

Los astrocitos son una población de células nerviosas de gran relevancia en la fisiología cerebral, tanto en condiciones normales como patológicas. Este tipo celular incrementa la expresión del receptor de neurotrofinas TrkB en diferentes situaciones patológicas (Condorelli et al., 1994) (Belluardo et al., 1995), por ello decidimos estudiar la regulación de la expresión de TrkB mediante estímulos que asemejen situaciones de reactividad glial como son el aumento citoplásmico de los niveles de AMPc y  $Ca^{2+}$ .

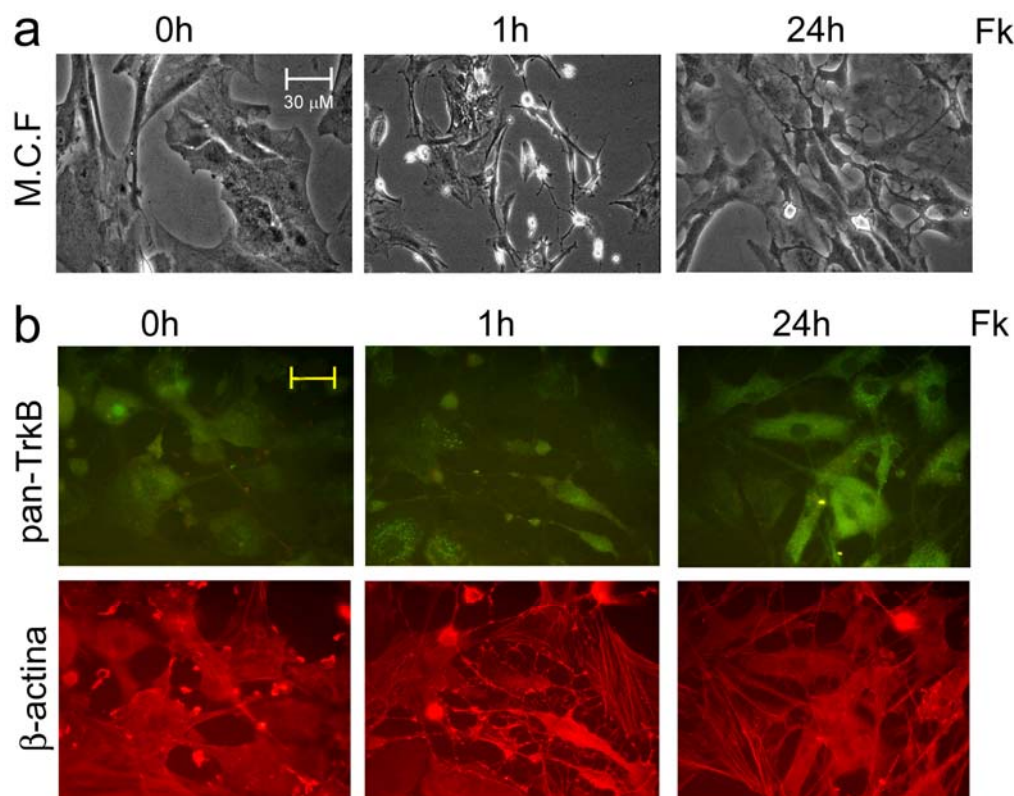
##### 4.1.1 La activación de la ruta AMPc/PKA/CREB aumenta la expresión de TrkB-T1 en cultivos primarios de astrocitos corticales.

El incremento de los niveles intracelulares de AMPc es capaz de promover una transformación morfológica en los astrocitos y un aumento de la expresión de la proteína GFAP (*glial fibrillary acid protein*). Estas modificaciones son interpretadas como signos de diferenciación o reacciones a situaciones patológicas similares a las que tienen lugar *in vivo* durante la gliosis reactiva (Condorelli et al., 1994). La presencia de dos elementos

putativos CRE (*cAMP/Ca<sup>2+</sup> response elements*) en la región promotora del gen *trkB* (Barettino et al., 1999), nos llevó a analizar la posible regulación de la expresión de dicho gen de manera dependiente de AMPc.

##### 4.1.1.1 Forskolina incrementa la expresión de TrkB-T1 a nivel de proteína y ARNm.

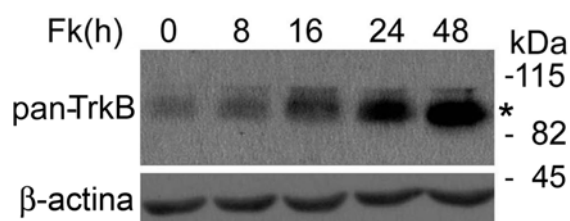
En primer lugar, analizamos el efecto que producía en cultivos primarios de astrocitos corticales el tratamiento con la droga Forskolina (Fk) durante diferentes periodos de tiempo. Este compuesto permite la activación específica de las enzimas adenilato ciclasas (AC), implicadas en la transformación del ATP a AMPc (Insel and Ostrom, 2003). Por microscopía de contraste de fase (Fig. 8 panel superior) pudimos comprobar como la Fk producía un cambio morfológico después de 1h de tratamiento, el cuál ya no era tan apreciable a las 24h. Por ensayos de inmunocitoquímica empleando un anticuerpo primario capaz de detectar todas las isoformas del receptor TrkB (anti-pan-TrkB), observamos que tras 24h de tratamiento se producía un aumento de la inmunofluorescencia específica para este receptor (Fig. 8, panel medio). Los niveles de otras proteínas como  $\beta$ -actina no se vieron afectados por el tratamiento (Fig. 8, panel inferior). Para determinar qué isoforma, o isoformas, eran las que aumentaban por el



**Figura 8. La estimulación de astrocitos primarios con Fk promueve un cambio morfológico y un aumento de la fluorescencia de TrkB.** (a) Cultivos primarios de astrocitos fueron incubados con Fk (30μM) los tiempos indicados. Las imágenes de microscopía óptica de contraste de fase (M.C.F) muestran el cambio morfológico que sufren los cultivos a lo largo del tratamiento. (b) Astrocitos tratados con Fk como anteriormente fueron analizados por inmunocitoquímica, usando un anticuerpo anti-pan-TrkB (verde) y un anticuerpo anti-β-actina (rojo). Las imágenes de microscopía de fluorescencia muestran un aumento significativo de la inmunofluorescencia de TrkB a las 24h de estimulación con Fk. La barra de escala representa 30μM.

tratamiento con Fk, realizamos ensayos de inmunodetección en filtro (*Western Blot*; WB) con el anticuerpo anti-pan-TrkB. Mediante estos ensayos observamos una sola proteína de un peso molecular de 95kDa, correspondiente a la isoforma truncada de TrkB (TrkB-T), cuya inmunoreactividad aumentaba con el tiempo de tratamiento con Fk (Fig. 9). Mediante ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) utilizando oligonucleótidos específicos para la secuencia del ARNm de TrkB-T1 y de TrkB-F1,

decidimos comprobar si el aumento en los niveles de esta proteína era consecuencia de un incremento de la cantidad del número de transcritos. Mientras que no detectamos transcritos para TrkB-F1 en ninguna de las condiciones analizadas, sí observamos un aumento de los niveles de ARNm de TrkB-T1 de hasta 2 veces tras 8h de tratamiento con Fk y de hasta 3 veces después de 48h (Fig. 10). El pretratamiento durante 1h con Actinomicina D (ActD), inhibidor de la transcripción dependiente de la ARNpol II, resultó en la

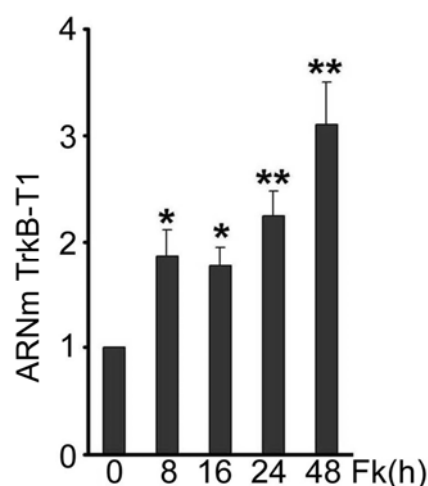


**Figura 9. Fk induce un aumento en los niveles de la proteína TrkB-T.** Lisados totales procedentes de astrocitos corticales estimulados con Fk (30 $\mu$ M) durante 8h, 16h, 24h y 48h, fueron analizados por WB, usando anticuerpos anti-pan-TrkB. Sólo se detectó una banda de 95 kDa correspondiente a la isoforma TrkB-T1 (\*). Utilizamos un anticuerpo anti- $\beta$ -actina como control de la especificidad del proceso.

inhibición del aumento del número de transcritos de TrkB-T1 que tenía lugar después de 8h de estimulación con Fk (Fig. 11). Estos resultados nos permitieron concluir que los astrocitos incrementan la expresión de TrkB-T1, tanto a nivel de ARNm como de proteína, por tratamiento con Fk por un mecanismo que supone la regulación de la transcripción del gen, puesto que es inhibido por el tratamiento con ActD.

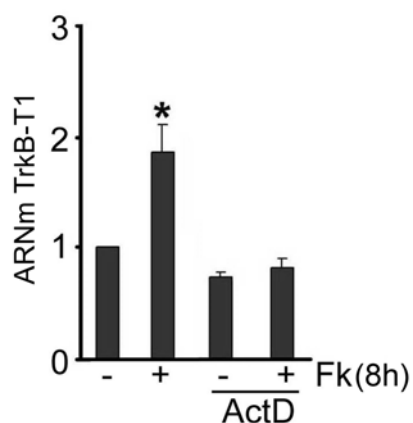
#### *4.1.1.2 Forskolina incrementa los niveles de fosforilación del factor de transcripción CREB.*

Dado que el tratamiento con Fk induce la transcripción de *trkB* en astrocitos corticales, decidimos estudiar los mecanismos moleculares que podrían estar controlando esta regulación dependiente del aumento de los niveles intracelulares de AMPc. Por ello



**Figura 10. Aumento específico de los transcritos de TrkB-T1.** Se sintetizó ADNc a partir de ARN total (2 $\mu$ g) procedente de astrocitos corticales tratados con Fk (30 $\mu$ M) durante diferentes tiempos (entre 0h y 48h). Se cuantificaron los niveles de ARNm para TrkB-T1 y TrkB-FI mediante qRT-PCR empleando oligonucleótidos específicos para cada transcrito. Para la normalización de los resultados, se usaron los niveles de ARNm de GAPDH, utilizados como control interno. Los resultados muestran la media  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes. Los datos se presentan como valores relativos respecto a las células sin tratar. La diferencia estadística entre los datos de células tratadas y no tratadas se determinó mediante la prueba *t* de Student (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01).

centramos nuestro estudio en el factor de transcripción CREB, cuya activación depende del aumento intracelular de los niveles tanto de AMPc como de Ca<sup>2+</sup>. Mediante ensayos de inmunocitoquímica usando un anticuerpo capaz de reconocer de manera específica la forma fosforilada activa del factor de transcripción CREB (P-CREB), comprobamos que astrocitos estimulados durante 30min con Fk presentaban un aumento de fluorescencia para P-CREB. Sin embargo, y después de 2h



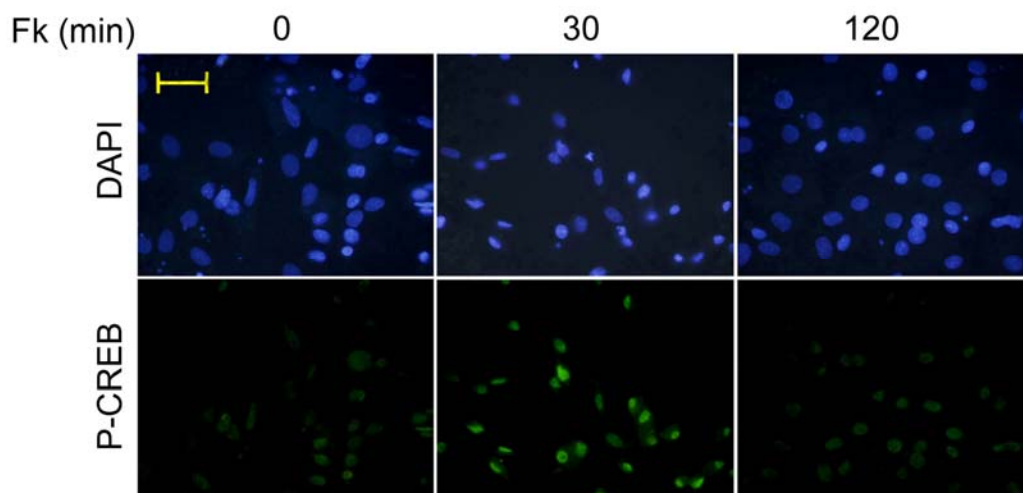
**Figura 11. Regulación transcripcional de *trkB* por Fk.**

Cultivos primarios de astrocitos fueron pretratados 1h con Actinomicina D (ActD; 2.5 $\mu$ M) antes de ser estimulados 8h con Fk (30 $\mu$ M) o vehículo (DMSO). Los niveles de ARNm de TrkB-T1 fueron cuantificados por qRT-PCR. Los resultados muestran la media  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes. Los datos se presentan como valores relativos respecto a las células sin tratar. La diferencia estadística entre los datos de células tratadas y control se determinó mediante la prueba *t* de Student (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01).

de tratamiento (Fig. 12), los niveles de fluorescencia eran similares a los basales. Determinamos por ensayos de WB (Fig. 13) que la adición de Fk produce una rápida activación de CREB, alcanzando un máximo de fosforilación de hasta 3 veces tras 10min de tratamiento, y recuperándose de nuevo los niveles basales de fosforilación transcurrida 1h.

#### 4.1.1.3 Forskolina induce la interacción del factor de transcripción CREB con los elementos CRE presentes en la región promotora P2 del gen *trkB*.

Como indicamos anteriormente, el análisis informático de la región 5' del gen *trkB* reveló la presencia de dos elementos putativos CRE (*trkB*-CREs) localizados entre las posiciones -920 y -900 del gen *trkB* (Barettino et al., 1999), espaciados entre sí por cuatro nucleótidos (gct CTG CGT Cag ccc TCA CGT CAc tt). Para determinar la presencia de proteínas nucleares capaces de unirse a dichos elementos, realizamos ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA). Para ello utilizamos un oligonucleótido, marcado radiactivamente con  $^{32}$ P, que contenía los elementos *trkB*-CREs y extractos nucleares procedentes de astrocitos tratados 4h con Fk. En los extractos proteicos procedentes de cultivos tratados con Fk (Fig. 14a), observamos un aumento en los complejos con  $^{32}$ P-*trkB*-CREs respecto a los presentes en células sin tratar. La unión de las proteínas nucleares al oligonucleótido marcado era específica, ya que dichos complejos desaparecían al añadir un exceso del mismo oligonucleótido sin marcar, pero no cuando el competidor contenía secuencias no relacionadas (Fig. 14a). Para determinar si CREB formaba parte del complejo, incubamos éstos con anticuerpos anti-CREB, o con anticuerpos contra el factor ATF-1, perteneciente a la familia de CREB, o la proteína nuclear p53 (Fig. 14b). La presencia del anticuerpo anti-CREB hizo disminuir los niveles de los complejos con  $^{32}$ P-*trkB*-CREs



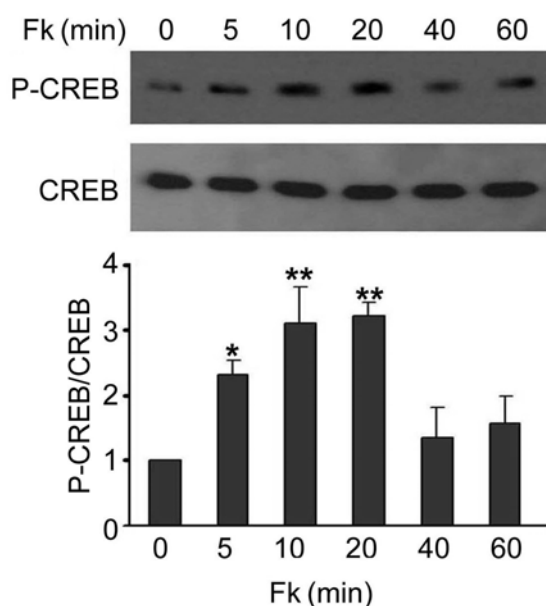
**Figura 12. Aumento de los niveles de P-CREB en el núcleo por estimulación con Fk.** Cultivos de astrocitos tratados con Fk (30 $\mu$ M) durante 30min y 120min fueron fijados y analizados por inmunocitoquímica con un anticuerpo específico para la forma activada fosforilada de CREB (P-Ser133-CREB; verde). Los nucleos se detectaron por tinción con DAPI (azul). En las imágenes de microscopía óptica de fluorescencia la barra de escala representa 30 $\mu$ M.

para dar lugar a otros de mayor tamaño molecular. Sin embargo, este hecho no se produjo en presencia de los otros dos anticuerpos (Fig. 14b), indicando que el efecto del anticuerpo anti-CREB era específico y reflejando la presencia de este factor de transcripción en el complejo con  $^{32}$ P-trkB-CREs. Estos resultados indican que CREB forma parte del complejo proteico que interacciona con los elementos trkB-CREs y que esta proteína, u otra relacionada, podría ser un mediador en la transcripción de *trkB* en respuesta a un aumento de AMPc en astrocitos.

#### 4.1.1.4 PKA/CREB median la activación del promotor P2 de *trkB* por Forskolina.

Dado que el tratamiento con Fk inducía la activación del factor de transcripción CREB y su unión a los elementos trkB-CREs, decidimos estudiar si estos elementos estaban implicados en la activación de la transcripción de *trkB* dependiente de Fk. Para ello, realizamos transfecciones transitorias utilizando plásmidos reporteros en los que secuencias del promotor de *trkB* regulan la expresión de la Luciferasa. El vector -1600P2-Luc, contiene la región desde -1600 a -320 del gen *trkB* que incluye los elementos trkB-CREs y el promotor P2, mientras que en el plásmido -1600 $\Delta$ CREsP2-Luc, los dos elementos trkB-CREs fueron deleccionados. Además, cotransfectamos los cultivos de astrocitos con el plásmido pRL-SV40, que contiene el promotor del virus SV40 seguido de la secuencia codificante del gen luciferasa de la

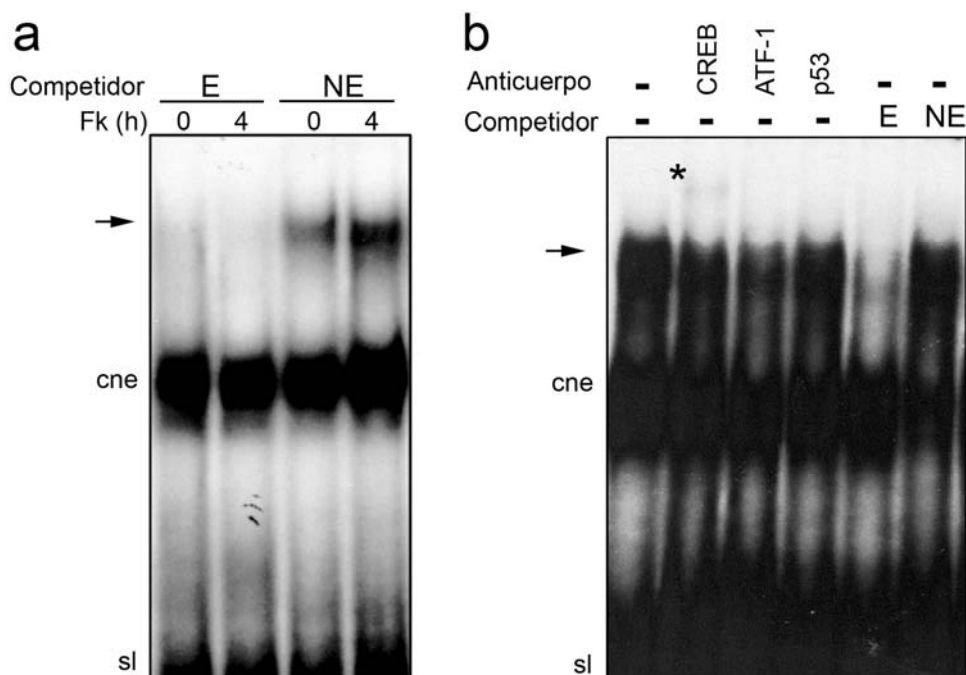




**Figura 13. Fosforilación transitoria de CREB dependiente de Fk.** Cultivos de astrocitos tratados con Fk (30 $\mu$ M) durante diferentes periodos de tiempo (entre 0min y 60min), analizados por WB usando un anticuerpo que reconoce CREB, o la forma fosforilada activa de CREB (P-CREB). Los niveles totales de CREB y de P-CREB tras el tratamiento con Fk se determinaron mediante el programa de análisis *NIH Image*. Los niveles de P-CREB se normalizaron con los niveles totales de CREB. Los resultados muestran la media  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes. Los datos se presentan como valores relativos respecto a las células sin tratar. La diferencia estadística entre los datos de células tratadas y control se determinó mediante la prueba *t* de Student (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

Renilla. Utilizamos la actividad luciferasa de Renilla como control de transfección y en la normalización de los resultados, dado que su expresión no se modificaba por el tratamiento con Fk. Al tratar 8h con Fk los astrocitos transfectados con el vector -1600-P2-Luc, observamos un aumento de hasta 3 veces en la actividad luciferasa en comparación con las células sin tratar. No observamos dicho efecto

cuando los cultivos tratados habían sido transfectados con el vector -1600 $\Delta$ CREsP2-Luc (Fig. 15), indicando que los elementos *trkB*-CREs son requeridos para la activación del promotor de *trkB* dependiente de Fk. Como la señal que produce el aumento del segundo mensajero AMPc es transducida mediante la activación de la proteína kinasa A (PKA) (Insel and Ostrom, 2003); (Nichols et al., 1992), decidimos estudiar si dicha proteína pudiera estar controlando la regulación del promotor P2. Para ello realizamos cotransfecciones con un vector de expresión de una forma constitutivamente activada de la subunidad catalítica de PKA y el vector -1600-P2-Luc. En dichos ensayos observamos un aumento de la actividad luciferasa de hasta 4 veces, mientras que la expresión de un mutante inactivo de PKA (mPKA) (Howard et al., 1991) no tenía ningún efecto (Fig. 16a). Además el vector -1600 $\Delta$ CREs-P2-Luc fue incapaz de responder a la expresión de PKA. Para confirmar que la regulación del promotor P2 por Fk estaba mediada por la activación de PKA, expresamos el inhibidor de PKA (PKI) (Day et al., 1989). Los astrocitos cotransfectados con el vector de expresión de PKI y el vector -1600-P2-Luc no mostraron aumento de la actividad luciferasa al ser tratados con Fk (Fig. 16b), pero sí al ser transfectados con un mutante inactivo de PKI (mPKI) (Fig. 16b). Finalmente y corroborando que la activación del promotor de *trkB* es



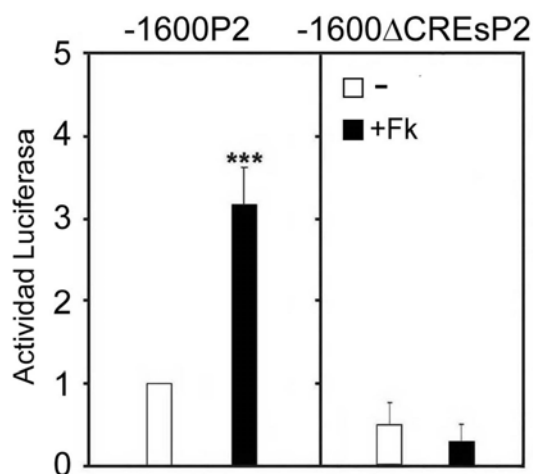
**Figura 14. Creb está presente en los complejos proteicos que se unen a los elementos trkB-CREs.** (a) EMSA usando un oligonucleótido de 25pb marcado con  $^{32}\text{P}$  que contiene los elementos trkB-CREs y extractos nucleares de astrocitos estimulados con DMSO (0) ó Fk (30 $\mu\text{M}$ ) durante 4h (4). Los oligonucleótidos competidores no marcados contenían los elementos trkB-CREs (E), o una secuencia no relacionada (NE). La concentración molar de los competidores era 100 veces la de la sonda específica marcada. (b) Los extractos nucleares de astrocitos tratados 4h con Fk (30 $\mu\text{M}$ ) fueron incubados con anticuerpos anti-CREB, anti-ATF-1 o anti-p53 y después analizados por EMSA. Los competidores E y NE se utilizaron como anteriormente. La flecha indica los complejos específicos, mientras que el asterisco señala los complejos de menor movilidad electroforética generados por el anticuerpo anti-CREB. Los complejos de retardo no específicos se indican por “cne” y la sonda libre presente en el frente del gel por “sl”.

debida a CREB, cotransfectamos con un dominante negativo de CREB, K-CREB. Éste presenta una mutación en el dominio de unión a DNA que impide la asociación del factor endógeno a los elementos CRE al formarse los heterodímeros KCREB:CREB (Walton et al., 1992). La expresión de K-CREB, impidió el aumento de la actividad luciferasa en los cultivos de astrocitos transfectados con el reportero -1600-P2-Luc y tratados con Fk (Fig. 16b). De manera conjunta, estos datos indican que en astrocitos corticales el

tratamiento con Fk regula la activación del promotor P2 del gen *trkB* a través de la ruta de señalización PKA/CREB.

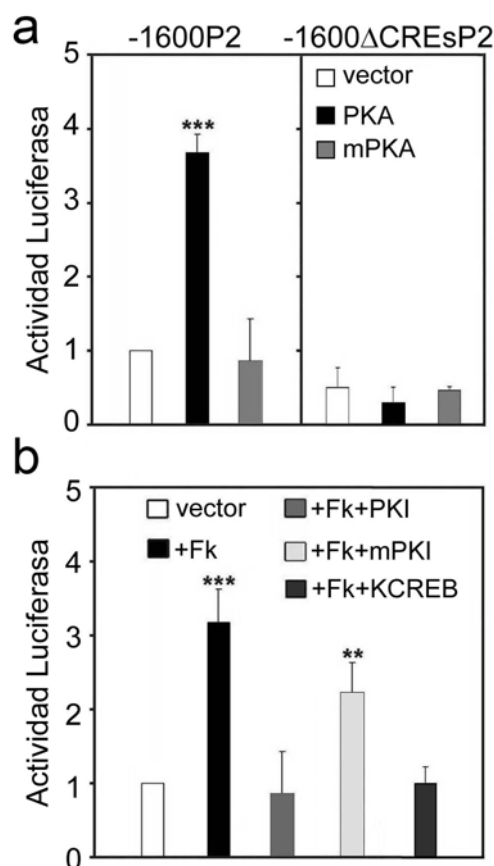
#### *4.1.2 La activación de receptores purinérgicos induce la expresión de TrkB-T1 en cultivos primarios de astrocitos corticales por activación de la ruta $\text{Ca}^{2+}$ /CaMK/CREB.*

El factor de transcripción CREB es activado por diversos estímulos, como el aumento de AMPc, y el aumento de los niveles



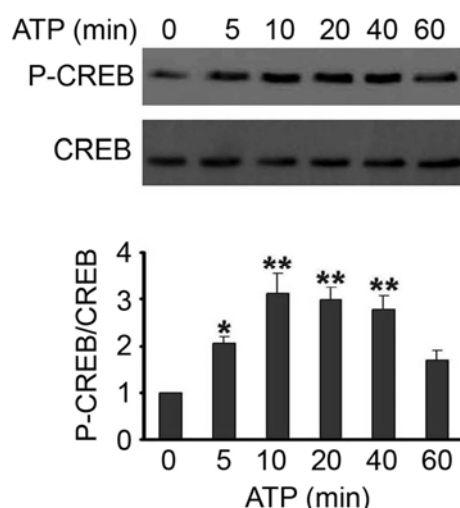
**Figura 15. Los elementos trkB-CREs son necesarios para la transactivación del promotor P2 dependiente de Fk.** Astrocitos cotransfectados con los vectores reporteros -1600P2-Luc (-1600P2) y pRL-SV40 fueron estimulados 8h con el solvente (-) o con Fk (30μM). Posteriormente, se determinó la actividad luciferasa y Renilla de los cultivos. Cultivos paralelos fueron cotransfectados con la construcción -1600ΔCREsP2-Luc (-1600ΔCREsP2), en la cuál se deleccionaron los elementos trkB-CREs, y el reportero pRL-SV40. Los resultados muestran la media ± D.E de tres experimentos independientes. Los datos se presentan como valores relativos respecto a las células sin tratar. La diferencia estadística entre los datos de células tratadas y las control se determinó mediante la prueba *t* de Student (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (Johannessen et al., 2004). En astrocitos, uno de los principales mecanismos por los que se produce un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular como respuesta a estímulos externos es el que depende de la activación de los receptores purinérgicos P2 por ATP. Altas concentraciones de ATP (1mM a 10mM) inducen la activación específica de los receptores P2X ionotrópicos, pero no de los



**Figura 16. La activación del P2 por Fk requiere la activación de PKA y CREB.** (a) Cultivos de astrocitos fueron cotransfectados con los vectores reportero -1600P2-Luc o -1600ΔCREsP2-Luc, y un vector de expresión de la forma constitutivamente activada de PKA (PKA) o un mutante inactivo (mPKA), además del vector reportero pRL-SV40. (b) Astrocitos corticales se cotransfectaron con el vector reportero -1600P2-Luc, el vector pRL-SV40, y el vector de expresión del inhibidor de PKA (PKI), o un mutante inactivo de PKI (mPKI), o un vector de expresión del dominante negativo de CREB (KCREB). Los cultivos fueron estimulados 8h con Fk (30μM). Los valores de todos los paneles corresponden a la media de la actividad luciferasa normalizada con la actividad Renilla. Los datos se presentan como valores relativos respecto a las células sin tratar. Los resultados muestran la media ± D.E de más de cuatro experimentos independientes. La diferencia estadística entre los datos de células tratadas y las control se determinó mediante la prueba *t* de Student (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).





**Figura 17. ATP induce la fosforilación de CREB en la Ser133.** Análisis por WB de lisados totales provenientes de astrocitos tratados con ATP (entre 0min y 60min), empleando anticuerpos anti-CREB, y anti P-CREB (P-Ser-133-CREB). Los niveles de P-CREB se normalizaron a los obtenidos para CREB. El análisis densitométrico se realizó con el programa *NIH Image*. Los resultados muestran la media  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes. Los datos se presentan como valores relativos respecto a las células sin tratar. La diferencia estadística entre los datos de células tratadas y las control se determinó mediante la prueba *t* de Student (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

receptores P2Y metabotrópicos, que movilizan el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular almacenado en el citoplasma (Centemeri et al., 1997); (Cornell-Bell and Finkbeiner, 1991); (James and Butt, 2002); (Pascual et al., 2005). El hecho de que el incremento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  permita la activación de diferentes cascadas de señalización que conducen a la regulación de varios factores de transcripción, nos indujo a estudiar si en nuestros cultivos la aplicación de ATP a altas concentraciones pudiera estar regulando la activación del factor

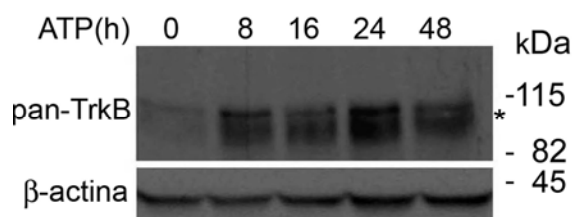
de transcripción CREB y la expresión de TrkB.

#### 4.1.2.1 ATP estimula la fosforilación de CREB en astrocitos.

Cuando analizamos por WB los niveles de P-CREB (P-Ser133) en astrocitos tratados con ATP (1mM) (Fig. 17) observamos que, después de 10min de estimulación, se producía un aumento de hasta 3 veces en los niveles de la forma fosforilada de CREB, manteniéndose éstos después de 20min de tratamiento y comenzando a decaer a los 40min. Tras 1h de estimulación con ATP, el aumento en los niveles de P-CREB sobre los niveles basales no era significativa, indicando que la activación de CREB por ATP es transitoria.

#### 4.1.2.2 ATP incrementa la expresión de TrkB-T1 a nivel de proteína y ARNm.

Como observamos que la expresión de TrkB podía ser regulada por CREB a través del aumento de los niveles intracelulares de AMPc, y dado que este factor es fosforilado por un mecanismo dependiente de altas concentraciones de ATP (1mM) en cultivos primarios de astrocitos, decidimos comprobar si este estímulo era capaz de regular igualmente la expresión de TrkB en este tipo

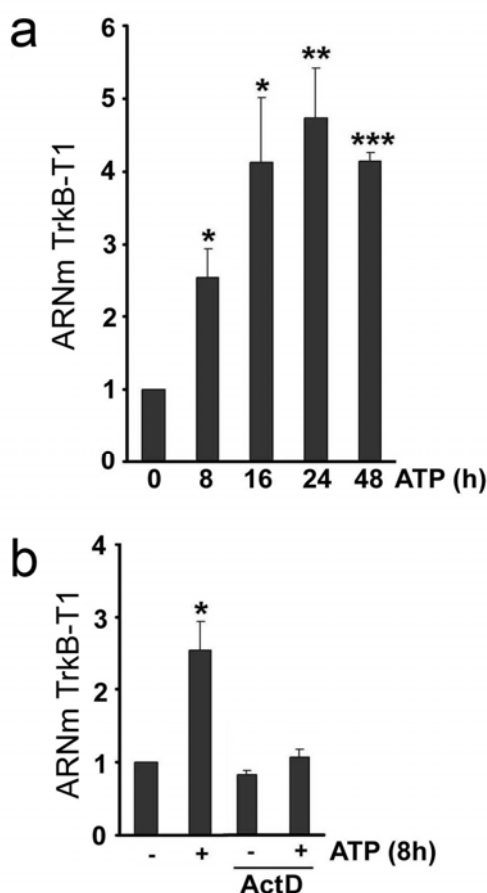


**Figura 18. Aumento de los niveles de la proteína TrkB-T1 por tratamiento con ATP.** Lisados de astrocitos estimulados con ATP (1mM) diferentes periodos de tiempo (0h a 48h) analizados por WB con un anticuerpo anti-pan-TrkB. Únicamente se detectó inmunoreactividad correspondiente a la isoforma truncada de TrkB (\*) a una altura de 95 kDa. Utilizamos como control de la especificidad del proceso un anticuerpo anti- $\beta$ -actina.

celular. Cuando analizamos mediante WB extractos proteicos obtenidos de astrocitos tratados con ATP con los anticuerpos anti-pan-TrkB (Fig. 18), observamos que la isoforma truncada de TrkB aumentaba con el tiempo de tratamiento. Al analizar por qRT-PCR los distintos transcritos de TrkB (Fig. 19a), observamos un aumento de alrededor de 3 veces en los niveles de ARNm de *trkB*-T1 después de 8h de estimulación con ATP, y de hasta 4.5 veces transcurridas 48h. Además, y como cabría esperar, el pretratamiento con ActD durante 1h (Fig. 19b) impidió el aumento de los transcritos de TrkB-T1 inducido por 8h de tratamiento con ATP. Estos datos indican una regulación transcripcional del gen *trkB* dependiente de la estimulación de astrocitos con ATP.

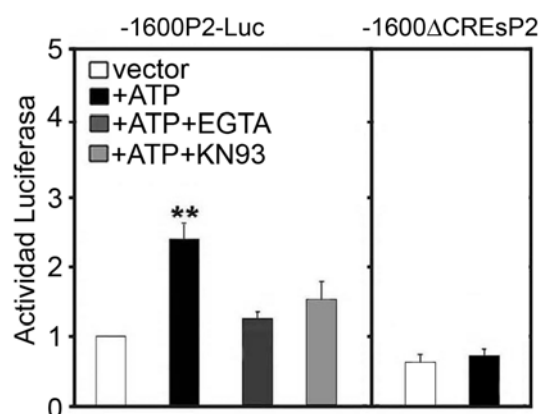
#### 4.1.2.3 La ruta de señalización $Ca^{2+}$ /CaMK media la activación del promotor P2 de *trkB* de manera dependiente de ATP.

Dado que el ATP (1mM) es capaz de inducir la fosforilación de CREB y el aumento de la expresión de TrkB en los cultivos primarios de astrocitos, decidimos estudiar si, también en este caso, son necesarios los elementos CREs que dirigen la activación del promotor P2 de *trkB* por estimulación con Fk. Para ello, realizamos experimentos de transfección transitoria en los cultivos primarios de astrocitos corticales con los plásmidos reporteros -1600P2-Luc o -1600 $\Delta$ CREsP2-Luc. Al analizar la actividad luciferasa, observamos un aumento de más de 2 veces respecto a los niveles basales en aquellos astrocitos transfectados con el reportero -1600P2-Luc y estimulados 8h con ATP, pero no al utilizar el plásmido en el cuál los elementos *trkB*-CREs se deleccionaron (Fig. 20). Este resultado demuestra que los elementos *trkB*-CREs son necesarios para la regulación de *trkB* de manera dependiente de ATP. El pretratamiento con el agente quelante de  $Ca^{2+}$  EGTA, o con el inhibidor de las proteínas CaMKs KN93, impidió el aumento de la actividad luciferasa inducido por ATP en los astrocitos transfectados con el vector -1600P2-Luc (Fig. 20). Este resultado indica que tanto la entrada de  $Ca^{2+}$  al citoplasma celular como la activación de los enzimas



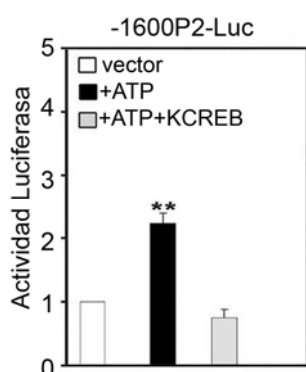
**Figura 19. Incremento de la transcripción de *trkB* por tratamiento con ATP.** (a) Mediante ensayos de qRT-PCR se determinaron los niveles de ARNm correspondientes a TrkB-T1 y TrkB-FI en astrocitos tratados con ATP durante diferentes periodos de tiempo (0h a 48h). Los valores obtenidos fueron normalizados respecto a los obtenidos para GAPDH. (b) Análisis por qRT-PCR de los niveles de ARNm correspondientes a TrkB-T1 y TrkB-FI en astrocitos pretratados 1h con ActD y 8h con ATP (1mM). Los niveles de TrkB-T1 se normalizaron con los de GAPDH. Los resultados muestran la media  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes. Los datos se presentan como valores relativos respecto a las células sin tratar. La diferencia estadística entre los datos de células tratadas y las control se determinó mediante la prueba t de Student (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

CaMK son necesarios para aumentar la actividad transcripcional del vector reportero.



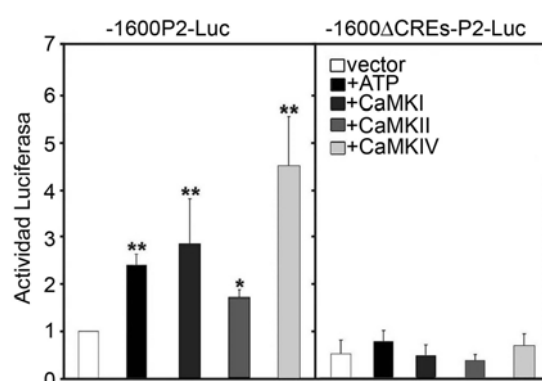
**Figura 20. ATP media la activación del promotor P2 de *trkB* de manera dependiente de  $Ca^{2+}$  y CaMKs.** Astrocitos cotransfectados con los vectores reporteros -1600P2-Luc y pRL-SV40 fueron pretratados o no durante 1h con el quelante de  $Ca^{2+}$ , EGTA, o el inhibidor de CaMKs, KN93. A continuación fueron estimulados durante 8h con ATP (1mM), tras lo cual se determinó la actividad luciferasa. Cultivos paralelos fueron cotransfectados con las construcciones -1600ΔCREs-P2-Luc y pRL-SV40 y estimulados de la misma manera con ATP (1mM). Los resultados muestran la media  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes. Los datos se presentan como valores relativos respecto a las células sin tratar. La diferencia estadística entre los datos de células tratadas y las control se determinó mediante la prueba t de Student (\*\* $p < 0.01$ ).

La estimulación con ATP no aumentó la actividad luciferasa cuando cotransfectamos el vector -1600P2-Luc junto con el dominante negativo KCREB, apoyando la conclusión de que es necesaria la unión de CREB al promotor P2 para que se produzca la activación de la transcripción dependiente de ATP (Fig. 21). Finalmente, para determinar cuál de las CaMK estaba implicada en la regulación del promotor P2 en astrocitos, cotransfectamos el vector -1600P2-Luc con un



**Figura 21. CREB participa en la activación de la transcripción de *trkB* dependiente de ATP.** Cultivos primarios de astrocitos fueron cotransfectados con el vector de expresión del dominante negativo de CREB, KCREB, el vector reportero -1600P2-Luc, y el vector pRL-SV40 como control interno. Dos días después de la transfección las células se estimularon 8h con ATP (1mM), y posteriormente se determinaron las actividades luciferasa y Renilla. Cada valor representa la media de la actividad luciferasa relativa  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes. Los datos se presentan como valores relativos respecto a las células sin tratar. La diferencia estadística entre los datos de células tratadas y las control se determinó mediante la prueba *t* de Student (\*\* $p < 0.01$ ).

vector de expresión para las formas constitutivamente activas de cada una de ellas (CaMKI, CaMKII o CaMKIV) (Maurer, 1989); (Sun et al., 1994) (Fig. 22). Observamos que la CaMKIV, con una inducción de la actividad luciferasa de hasta 5 veces en comparación con el control, era la más potente. La siguen la CaMKI, capaz de incrementar la actividad luciferasa hasta 3 veces, y la CaMKII, que sólo lo hacía 2 veces. Ninguna de las CaMKs fue capaz de producir aumento de la actividad luciferasa al ser cotransfectada con el vector reportero -

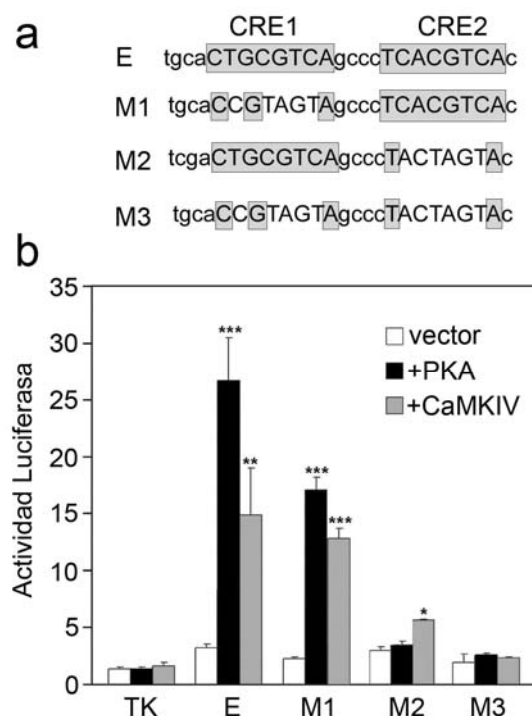


**Figura 22. Diferencias en la activación del promotor P2 de *trkB* por proteínas CaMK.** Cultivos primarios de astrocitos fueron transfectados con vectores de expresión de las formas constitutivamente activas de la CaMKI, CaMKII o CaMKIV, junto con el reportero -1600P2-Luc o el mutante de delección -1600ΔCREs-P2-Luc, y el vector pRL-SV40. Los resultados muestran las medias de la actividad luciferasa relativa  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes. Los datos se presentan como valores relativos respecto a las células sin tratar. La diferencia estadística entre los datos de células tratadas y las control se determinó mediante la prueba *t* de Student (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

1600ΔCREs-P2-Luc, lo que demostraba que dicha activación se realiza a través de los elementos *trkB*-CREs (Fig. 22). Estos resultados nos llevaron a concluir que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por activación de receptores purinérgicos permitía la activación del promotor P2 de *trkB* de manera dependiente de CaMK/CREB.

#### 4.1.3 Contribución de cada elemento CRE a la activación del promotor P2 de *trkB* por PKA y CaMKIV.

El vector reportero -1600P2-Luc utilizado en los experimentos de transfección transitoria anteriores contenía dos elementos CREs. En dichos experimentos no analizamos la contribución de cada uno de ellos a la activación del promotor P2 de *trkB* por activación dependiente de PKA o de CaMKs, y por tanto diseñamos experimentos para caracterizar si ambos elementos eran necesarios, o si cada uno de ellos podía activar el promotor de manera independiente. Generamos una serie de plásmidos en los cuales cada uno de los elementos CRE, o ambos, fueron mutados. Estos oligonucleótidos fueron clonados dirigiendo el promotor de la timidina kinasa (TK) del virus del herpes simplex en el vector reportero pTK-Luc (Fig. 23a). La cotransfección de estos plásmidos reporteros con los vectores de expresión de las formas constitutivamente activas de PKA y CaMKIV, nos permitió analizar la respuesta que producía la activación de CREB por estas proteínas en los cultivos de astrocitos. La mutación del primer elemento CRE (M1) redujo la actividad luciferasa de astrocitos cotransfectados con el vector de expresión de PKA o CaMKIV, en comparación con el vector que contenía ambos elementos sin mutar (Fig. 23b). Cuando mutamos el segundo elemento CRE (M2) la actividad luciferasa en respuesta a PKA se redujo a los niveles basales, pero sin embargo aún aumentaba la actividad luciferasa en



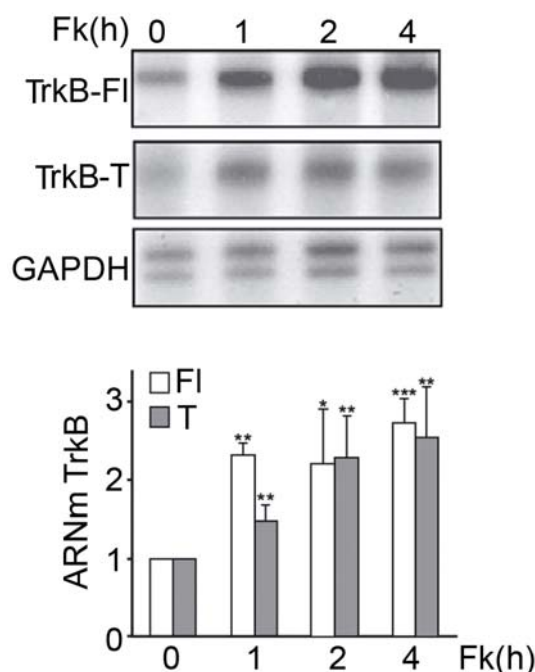
**Figura 23 .Contribución de los elementos *trkB*-CREs a la activación dependiente de PKA y CaMKIV.** (a) Secuencia del oligonucleótido clonado en el vector reportero pTK-Luc conteniendo los elementos *trkB*-CREs (E). Se muestra la secuencia del oligonucleótido con la mutación en el primer elemento CRE (M1), en el segundo (M2), o en ambos elementos (M3). (b) Astrocitos corticales fueron cotransfectados con el vector reportero pTK-Luc (TK) o el mismo vector conteniendo el oligonucleótido E, M1, M2 o M3, junto con el vector de expresión de la forma constitutivamente activa de PKA o de CaMKIV, además de con el vector reportero pRL-SV40. Los valores representan la media de la actividad luciferasa relativa  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes. Los datos se presentan como valores relativos respecto a las células sin tratar. La diferencia estadística entre los datos de células tratadas y las control se determinó mediante la prueba *t* de Student (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

aquellos cultivos transfectados con CaMKIV (Fig. 23b). Estos datos indican que en la regulación de la transcripción dependiente de PKA, el segundo elemento es imprescindible

aunque el primer elemento M1 también participa en dicha activación. En el caso de la señalización dependiente de CaMKIV parece que el segundo elemento es capaz, por sí solo, de conferir inducción de la transcripción, pero sin embargo el primer elemento requiere al segundo para que la estimulación llegue a los mismos niveles que la observada para los elementos sin mutar.

#### 4.2. Estudio de la regulación de la expresión del receptor de neurotrofinas TrkB en cultivos primarios de neuronas corticales.

Como indicamos en la Introducción, el receptor de neurotrofinas TrkB juega un importante papel en el mantenimiento y supervivencia neuronal. A diferencia de las células gliales, las neuronas expresan mayoritariamente la isoforma TrkB-FI mientras que la isoforma TrkB-T1, generada por procesamiento alternativo a partir del mismo gen, sólo se expresa de manera minoritaria. Una vez caracterizada la mediación por CREB de la activación de la transcripción de *trkB* de manera dependiente de PKA en astrocitos, nos planteamos la posibilidad de que este gen pudiera regularse de una manera similar en neuronas, lo que implicaría la modulación de la expresión de TrkB en respuesta a diferentes señales adaptativas de las que CREB es partícipe.

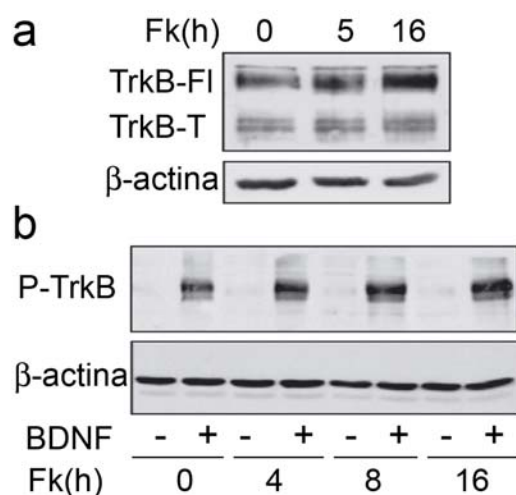


**Figura 24. Incremento de la expresión del ARNm de TrkB por Fk en neuronas corticales.** ARN total (20µg) aislado a partir de neuronas no tratadas o estimuladas con Fk (30µM) durante 1h, 2h y 4h, fue sometido a ensayos de protección frente a la actividad de ARNasas. La sonda TrkB empleada generaba una banda de 390pb, correspondiente a la isoforma TrkB-FI, y otra de 238pb correspondiente a TrkB-T. Como control se empleó una sonda que detectaba los transcritos de GAPDH. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas se realizó con el programa *NIH Image* (panel inferior) y se normalizaron los valores obtenidos para cada tratamiento con los correspondientes para GAPDH. Los datos muestran la media ± D.E de tres experimentos independientes y se presentan como valores relativos respecto a las células sin tratar. La diferencia estadística entre los datos de células tratadas y las control se determinó mediante la prueba t de Student (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

##### 4.2.1 Incremento de la expresión de las isoformas del gen *trkB* de manera dependiente de Forskolina.

Para determinar los niveles de TrkB, tanto a nivel de ARNm como de proteína, estimulamos cultivos primarios de neuronas corticales de 5 días de cultivo *in vitro* (Pandolfi et al.) con Fk (30 $\mu$ M) durante diferentes periodos de tiempo. Mediante ensayos de protección frente a la actividad de ribonucleasas (*Ribonuclease protection assay*; RPA) observamos un incremento de hasta 2.2 y 1.8 veces en los niveles de ARNm de las

isoformas TrkB-FI y TrkB-T, respectivamente, en neuronas tratadas 1h con Fk (Fig. 24). Además, los niveles de ambos transcritos aumentaron hasta 3 veces después de 4h de estimulación, el tiempo más largo analizado en los estudios de RPA. Este aumento en los niveles de ARNm iba acompañado de un incremento en los niveles de esta proteína determinados mediante ensayos de WB en neuronas corticales tratadas 5h y 16h con Fk (30 $\mu$ M) (Fig. 25a). A estos tiempos de tratamiento se producía un aumento de 3.4 veces en los niveles de la proteína TrkB-FI, y de 2.4 veces en los de TrkB-TI. Además, en ensayos de WB empleando un anticuerpo anti-pan-P-Trk, observamos que tras el tratamiento con Fk, hay un aumento del número de receptores TrkB-FI funcionales capaces de unir el ligando BDNF y responder transfosforilándose (Fig. 25b). El aumento tan rápido (después de 1h de estimulación) de los niveles de ARNm de TrkB, sugería que la regulación del gen *trkB* podía ser transcripcional, y mediada por la activación de CREB y su unión a las secuencias consenso presentes en los promotores del este gen.

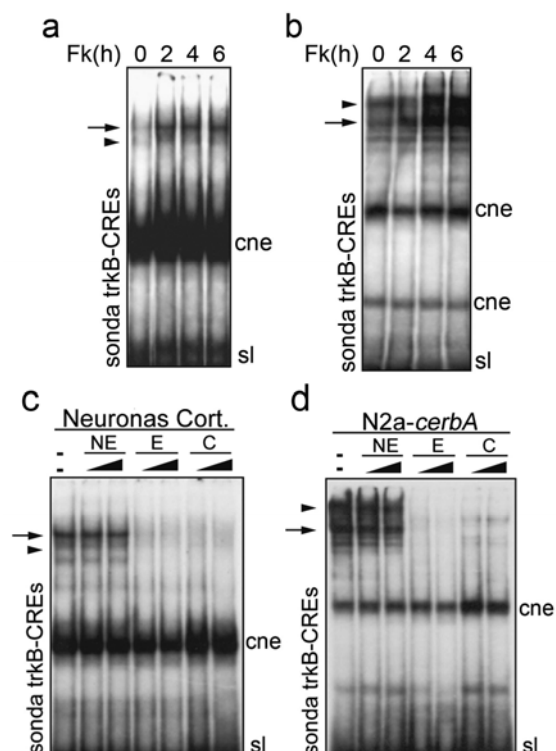


**Figura 25. Fk aumenta los niveles de los receptores TrkB-FI y TrkB-T en neuronas corticales.** (a) Lisados totales procedentes de cultivos primarios de neuronas corticales estimulados con Fk (30 $\mu$ M) durante 0h, 5h y 16h fueron analizados por WB con anticuerpos anti-pan-TrkB y anti- $\beta$ -actina. (b) Para determinar la presencia de receptores TrkB-FI funcionales en la membrana plasmática, los cultivos de neuronas corticales fueron estimulados con Fk los tiempos indicados y posteriormente tratados con BDNF (20ng/ml) durante 10min, para inducir la fosforilación del receptor. En los ensayos de WB se emplearon anticuerpos anti-pan-P-Trk, y anti- $\beta$ -actina. En ambos paneles se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes.

#### 4.2.2 CREB interacciona con los elementos *trkB*-CREs presentes en el gen *trkB*.



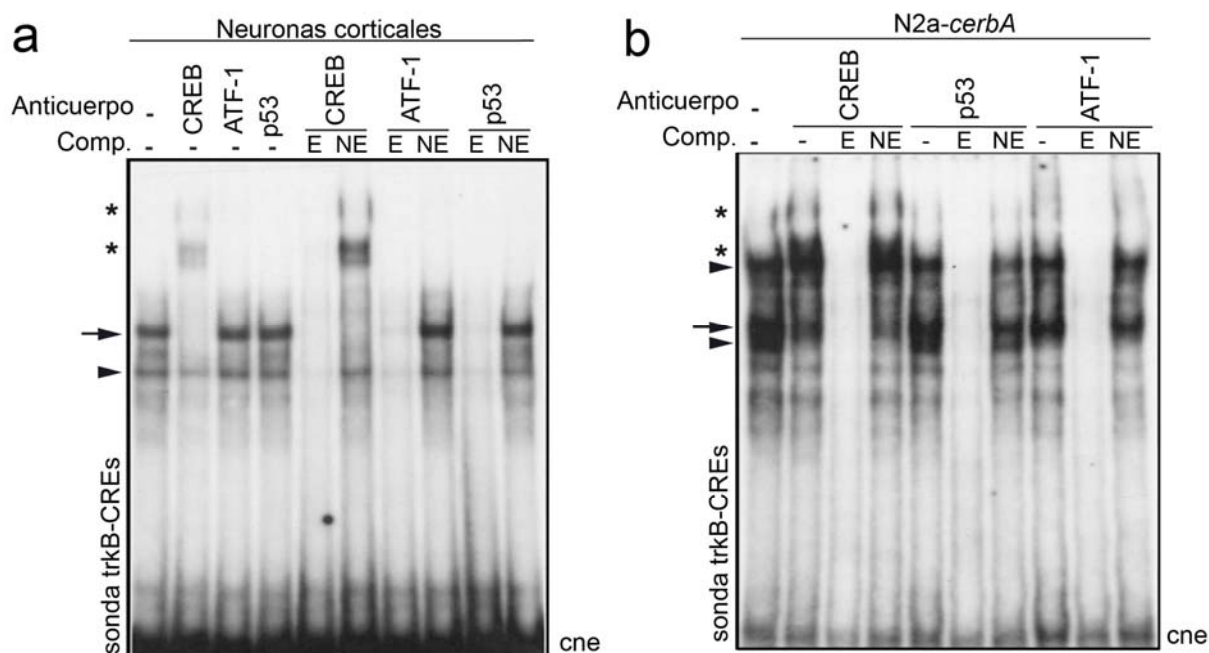
Con el fin de demostrar que los elementos trkB-CREs eran capaces de unir proteínas nucleares en respuesta a la estimulación con Fk, realizamos ensayos de EMSA con extractos nucleares de neuronas tratadas con esta droga durante 2h, 4h y 6h. Comparamos los resultados con los obtenidos de experimentos equivalentes, en los que utilizamos extractos nucleares procedentes de células N2a-*cerbA*. Esta línea está obtenida del neuroblastoma N2a, donde la presencia del receptor  $\alpha$  de la hormona tiroidea ( $TR\alpha$ ) hace que las células expresen el receptor TrkB-FI de manera constitutiva (Pastor et al., 1994). Tanto en neuronas (Fig. 26a) como en células N2a-*cerbA* (Fig. 26b) Fk inducía la unión de proteínas a los elementos trkB-CREs. Es interesante destacar que en las células N2a-*cerbA* se detectaron dos complejos de retardo tras la estimulación con Fk, a diferencia de las neuronas en las que sólo se formó uno. A continuación, caracterizamos la especificidad de la unión. Para ello, durante la incubación de las proteínas nucleares con el oligonucleótido marcado que contenía los elementos trkB-CREs, añadimos un exceso de oligonucleótido sin marcar no específico (NE), que contenía los elementos trkB-CREs (E), o la secuencia del elemento CRE consenso (C) (la secuencia de los tres oligonucleótidos mencionados queda reflejada en la Fig. 23a). En estos ensayos observamos que la competición con un exceso molar de 50



**Figura 26. Neuronas corticales y células N2a-*cerbA* contienen proteínas capaces de unirse a los elementos trkB-CREs por estimulación con Fk.** Ensayos de retardo en la movilidad electroforética usando extractos nucleares de neuronas corticales (a) y células N2a-*cerbA* (b), estimuladas con Fk (30 $\mu$ M) durante diferentes períodos de tiempo e incubados en presencia de un oligonucleótido marcado con  $^{32}$ P que contenía los elementos trkB-CREs (c, d) Para determinar la especificidad de los complejos formados se añadió la sonda sin marcar que tenía los elementos trkB-CREs (E), el elemento CRE del gen de la *somatostatina* (C), o una secuencia no relacionada (NE), a una concentración molar 50 y 100 veces superior a la de la sonda marcada. Todas las imágenes corresponden a un experimento representativo procesado en paralelo para asegurar la misma movilidad de las bandas de retardo, indicadas mediante flechas y puntas de flecha. Los complejos no específicos están indicados como “cne” y la sonda libre como “sl”.

y 100 veces de los oligonucleótidos E y C, inhibía la aparición de los complejos de

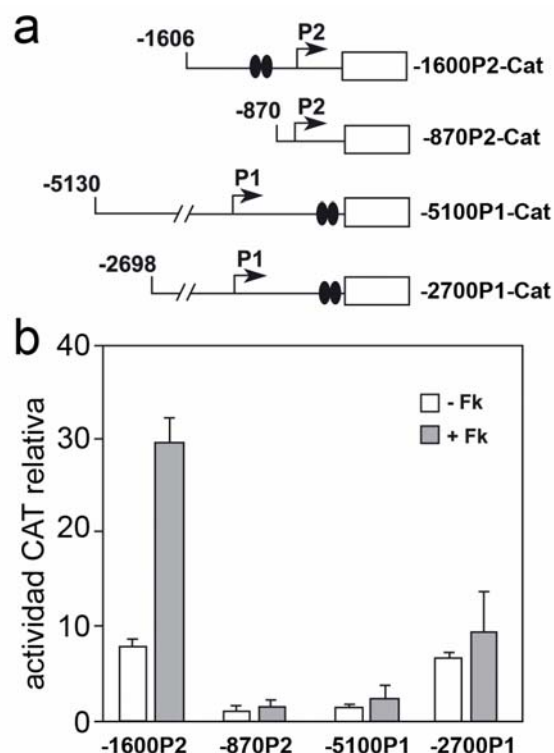




**Figura 27. CREB forma parte del complejo proteico de unión a los elementos trkB-CREs.** Proteínas nucleares de neuronas corticales (a) o células N2a-*cerbA* tratadas con Fk (30 $\mu$ M) durante 4h, fueron sometidos a ensayos de EMSA en presencia de una sonda marcada con  $^{32}$ P conteniendo los elementos trkB-CREs, y de anticuerpos anti-CREB, anti-ATF-1 o anti-p53. En los ensayos de competición, se añadió sonda sin marcar conteniendo los elementos trkB-CREs (E), o una secuencia no relacionada (NE), siendo su concentración molar 100 veces superior a la de la sonda marcada. Las bandas presentes en el frente del gel corresponden a los complejos no específicos (cne). Las bandas de retardo se indican con las flechas y puntas de flecha. Los asteriscos indican las bandas de retardo generadas por los anticuerpos anti-CREB y/o anti-ATF-1.

proteína con  $^{32}$ P-trkB-CREs, tanto en neuronas corticales (Fig. 26c), como en células N2a-*cerbA* (Fig. 26d). Sin embargo los complejos no se vieron afectados al añadir un exceso molar del oligonucleótido NE. Para determinar si CREB estaba presente en los complejos proteicos que se unían al oligonucleótido trkB-CREs, añadimos durante la incubación el anticuerpo anti-CREB, y a continuación realizamos el ensayo de EMSA. Encontramos que, en presencia del anticuerpo anti-CREB, se producía un retardo adicional en la movilidad del complejo mayoritario en neuronas corticales pero no del complejo

minoritario (Fig. 27a). Los anticuerpos anti-ATF-1, o anti-p53, no modificaron la migración de los complejos, indicando que el efecto del anticuerpo anti-CREB era específico y que, por tanto, dicho factor de transcripción se encontraba presente en el complejo de proteínas con  $^{32}$ P-trkB-CREs. Por otro lado, la adición del anticuerpo anti-CREB a los extractos procedentes de células N2a-*cerbA* produjo el retardo del complejo mayoritario, al igual que el anticuerpo anti-ATF-1, lo que sugería que en el caso de estas células ambos factores de transcripción se



**Figura 28. La transactivación del promotor P2 de *trkB* en respuesta a Fk requiere los elementos *trkB*-CREs.**

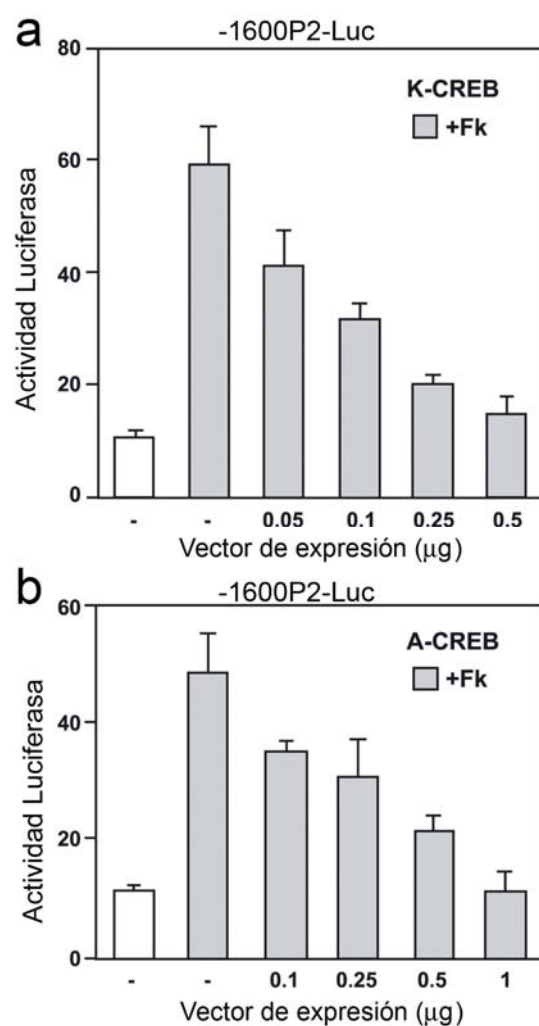
(a) Representación esquemática de las distintas construcciones empleadas en ensayos de transactivación del gen *trkB* en presencia de Fk (30 $\mu$ M). En la figura se muestra la posición del inicio de transcripción de los promotores P1 y P2, así como la presencia de los elementos *trkB*-CREs (doble elipse), y la secuencia codificante del gen *cloranfenicol acetil transferasa* (*cat*). Los números con valores negativos indican la longitud de la región más 5' del gen *trkB* clonada en el vector respecto del codón de inicio de la traducción. (b) Células N2a-*cerbA* fueron cotransfectadas con los vectores reporteros de (a) y el vector reportero de luciferasa pSV40-Luc. La estimulación con Fk (30 $\mu$ M) se inició 16h después de la transfección y duró 8h. Los valores representan la media  $\pm$  D.E de la actividad CAT normalizada a la actividad luciferasa de tres experimentos diferentes.

unían a los elementos *trkB*-CREs por estimulación con Fk.

#### 4.2.3 Los elementos *trkB*-CREs y *CREB* son necesarios para la activación del promotor P2 en respuesta a Forskolina.

El gen *trkB* se transcribe a través de dos promotores diferentes denominados P1 y P2 (Barettino et al., 1999). Como hemos comprobado en astrocitos, la activación del promotor P2 por Fk depende de los elementos *trkB*-CREs. Con el fin de determinar su capacidad de activación del gen *trkB* en cultivos primarios de neuronas corticales en respuesta a un aumento intracelular de los niveles de AMPc, utilizamos varios plásmidos reporteros conteniendo el gen de la proteína Cloranfenicol acetil transferasa (*cat*) y distintas secuencias de las regiones promotoras del gen *trkB*, que habían sido generados y estaban disponibles en nuestro laboratorio (Fig. 28a). En primer lugar realizamos los ensayos de transactivación en la línea celular N2a-*cerbA*, que tiene una eficiencia de transfección elevada. Observamos que las células transfectadas con el vector -1600P2-Cat, que contenía los dos elementos *trkB*-CREs y el promotor P2, presentaban un incremento de la actividad CAT de hasta 3 veces 8h después de haber sido estimuladas con Fk (30 $\mu$ M). Este efecto desaparecía cuando transfectamos el vector -870P2-Cat, que carece de los elementos *trkB*-CREs (Fig. 28b). Es interesante resaltar que los elementos *trkB*-CREs no conferían

transactivación por Fk al promotor P1, como pudimos observar al realizar los mismos ensayos pero con los vectores -5100P1-Cat y -2700P1-Cat (Fig. 28b). Los resultados obtenidos en los ensayos de EMSA indicaban que CREB forma parte del complejo proteico que se une al promotor *trkB*, pero sin embargo no permiten conocer hasta qué punto este factor es necesario para la activación del promotor P2. Así, decidimos examinar el efecto que tendría la expresión de dos diferentes mutantes dominantes negativos de CREB sobre la activación del vector reportero -1600P2-Luc en respuesta a Fk en células N2a-*cerbA*. Ensayos de cotransfección con el vector de expresión de K-CREB y el reportero -1600P2-Luc, demostraron que la actividad del promotor era inversamente proporcional a la concentración de este plásmido (Fig. 29a). Se obtuvo el mismo resultado cuando realizamos los mismos ensayos empleando A-CREB, otra forma mutante de CREB caracterizada por ser incapaz de unirse a los elementos CRE pero capaz de dimerizar con el CREB endógeno (Ahn et al., 1998), es decir, la actividad luciferasa disminuía al aumentar la concentración del vector de expresión de A-CREB (Fig. 29b). Estos resultados sugieren que CREB juega un importante papel en la mediación de la respuesta del promotor P2 de *trkB* al incremento de los niveles intracelulares de AMPc producido por el tratamiento con Fk.

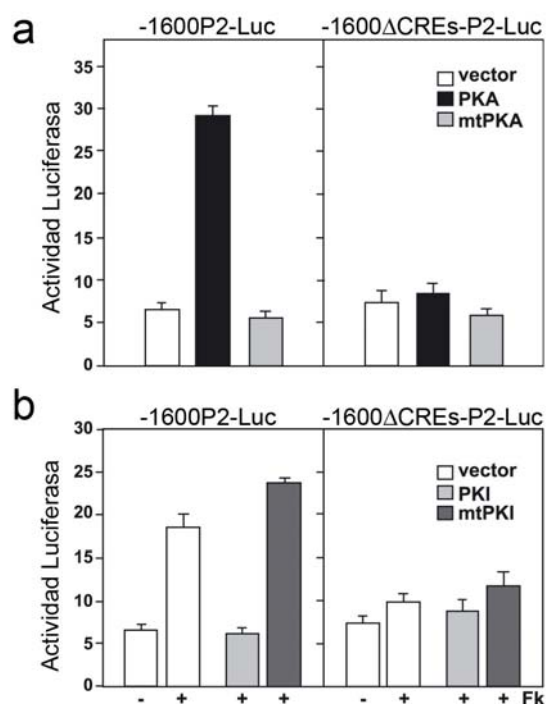


**Figura 29. CREB media la transcripción de *trkB* a través del promotor P2.** Células N2a-*cerbA* fueron cotransfectadas con distintas concentraciones de los vectores de expresión de las formas dominantes negativas de CREB, K-CREB (a) y A-CREB (b), el vector reportero -1600P2-Luc y el vector pSV40-LacZ, utilizado como control interno de la transfección. Transcurridas 16h las células fueron estimuladas con Fk durante 6h. Los datos representan la media  $\pm$  D.E de los valores de la actividad luciferasa normalizada con la actividad  $\beta$ -galactosidasa de tres experimentos diferentes.

#### 4.2.4 PKA media la activación de la transcripción del promotor P2 de *trkB* en

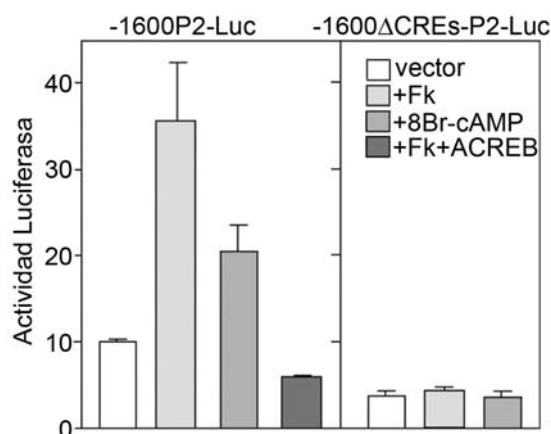
### neuronas corticales en respuesta a Forskolina.

Para evaluar de manera directa la intervención de PKA y la fosforilación de CREB en el control de la expresión de *trkB*, decidimos estudiar el efecto de la expresión de la forma constitutivamente activa de PKA sobre la activación del promotor P2 (Howard et al., 1991). Como mostramos en la Fig. 30a, la expresión de PKA en células N2a-*cerbA* producía un aumento de hasta 6 veces en la actividad del vector reportero -1600-P2-Luc, mientras que no lo hacía si expresábamos la forma mutante inactiva (mPKA). Además, la inhibición de la fosforilación de CREB por expresión del inhibidor de PKA (PKI) (Day et al., 1989), impidió la transactivación del vector -1600-P2-Luc al tratar las células con Fk (Fig. 30b), mientras que la expresión de un mutante inactivo de PKI (mPKI) no fue capaz de impedir dicho aumento (Fig. 30b). Para corroborar que la actividad de PKA requiere los elementos *trkB*-CRE, realizamos experimentos de cotransfección de PKA con el vector de delección -1600 $\Delta$ CREs-P2-Luc. Estos resultados indican que la activación del promotor P2 por Fk estaba mediada por un mecanismo dependiente de la fosforilación de CREB por PKA, y requieren la presencia de los elementos *trkB*-CREs. Para confirmar que el mismo mecanismo estaba mediando la



**Figura 30. La activación del promotor P2 de *trkB* depende de la ruta PKA/CREB y de los elementos *trkB*-CREs.** (a) Células N2a-*cerbA* fueron transfectadas con un vector de expresión de la forma constitutivamente activa de PKA (PKA), o un mutante inactivo de PKA (mPKA), junto con los vectores reporteros -1600P2Luc, o -1600 $\Delta$ CREsP2-Luc, y el vector pRL-SV40. (b) Células N2a-*cerbA* fueron cotransfectadas con el vector de expresión del inhibidor de PKA (PKI), o un mutante inactivo de PKI (mPKI), junto con el reportero -1600P2-Luc o el reportero -1600 $\Delta$ CREs-P2-Luc, y la construcción pRL-SV40. Las células fueron estimuladas 6h con Fk transcurridas 16h desde la transfección. Los valores obtenidos de luciferasa se normalizaron a los datos correspondientes a Renilla. En los ensayos control se cotransfectó además el correspondiente vector parental de expresión. Los datos representan la media  $\pm$  D.E de los valores de la actividad luciferasa normalizada con la actividad  $\beta$ -galactosidasa de tres experimentos diferentes

activación del promotor P2 en nuestros cultivos primarios de neuronas corticales, realizamos ensayos de transfección transitoria



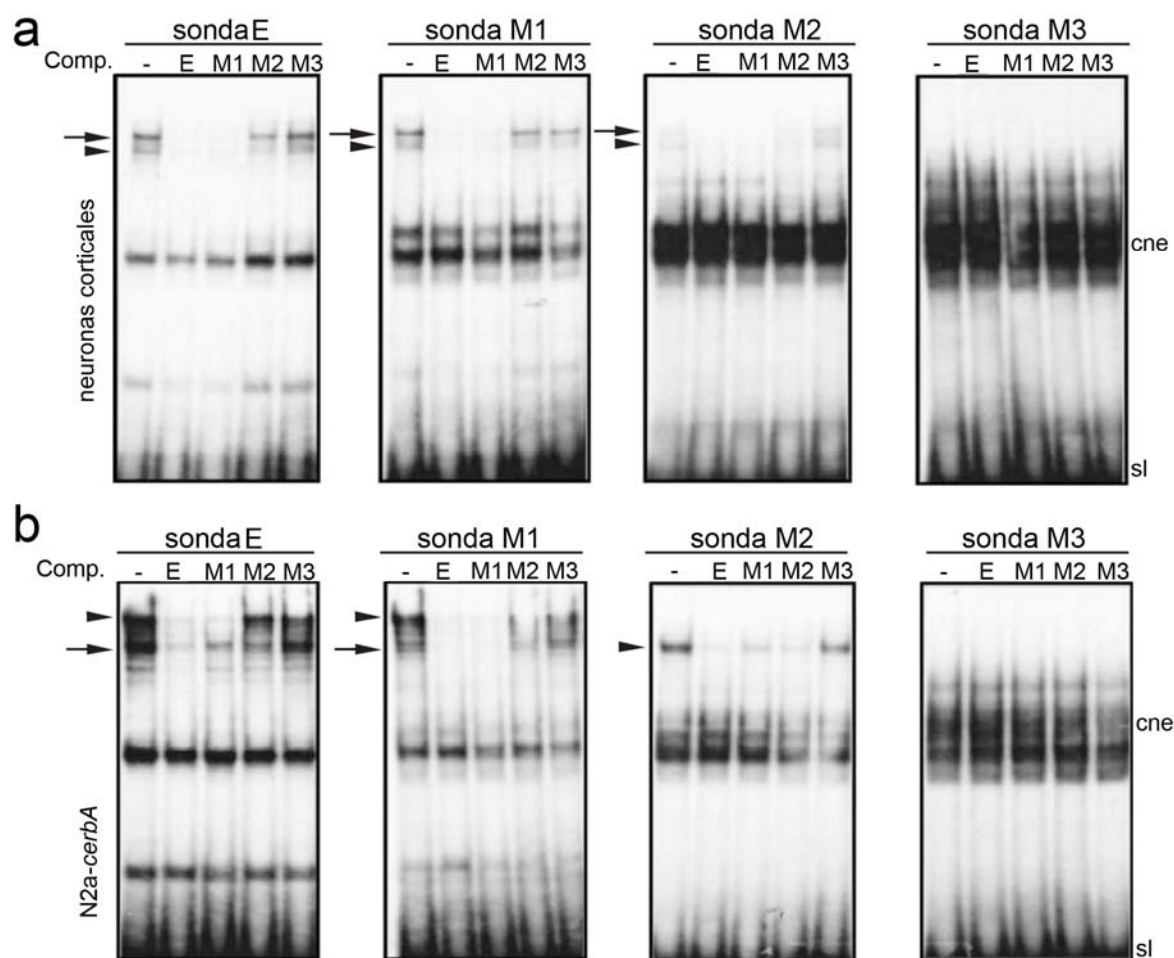
**Figura 31. La activación del promotor P2 de *trkB* en neuronas corticales por Fk está mediada por CREB y los elementos *trkB*-CREs.** Neuronas corticales fueron transfectadas con el vector reportero -1600P2-Luc, o el mutante de delección -1600ΔCREs-P2-Luc y el vector pRL-SV40. Transcurridas 48h las células fueron estimuladas con 8Br-AMPC (2mM) o Fk (30μM) durante 6h. Cultivos paralelos fueron cotransfectados con el vector de expresión de A-CREB y estimulados con Fk como anteriormente (+Fk+ACREB). Los valores de Luciferasa se normalizaron con los obtenidos para Renilla. Los datos representan la media ± D.E de los valores de la actividad luciferasa normalizada con la actividad β-galactosidasa de tres experimentos diferentes.

con el vector -1600-P2-Luc, y el vector de delección -1600ΔCREs-P2-Luc, y estudiamos su transactivación en respuesta a la estimulación con Fk o el análogo no hidrolizable del AMPc, 8Br-AMPC (Fig. 31). El tratamiento con cualquiera de estos fármacos producía la transactivación del vector -1600-P2-Luc, pero no la del vector de delección. Además, la activación del promotor P2 por Fk se veía inhibida cuando cotransfectamos el vector de expresión del mutante inactivo A-CREB, lo que apoya la

idea de que CREB está mediando la activación por Fk/AMPC del promotor P2 del gen *trkB* también en neuronas corticales.

#### 4.2.5 El segundo elemento *trkB*-CRE es responsable de la transactivación y unión de CREB mediada por Forskolina.

Para evaluar la contribución de cada elemento CRE a la activación por CREB del promotor P2 de *trkB*, usamos oligonucleótidos marcados con  $^{32}\text{P}$  que contenían los dos elementos *trkB*-CREs (E), mutaciones en cada uno de ellos (M1, M2), o en ambos (M3). Se realizaron ensayos de EMSA con extractos nucleares de neuronas corticales (Fig. 32a) o células N2a-*cerbA* (Fig. 32b) tratadas con Fk (30μM) que fueron incubados con los oligonucleótidos anteriores. Observamos la generación de complejos específicos de retardo en el caso de los oligonucleótidos E y M1. Sin embargo, la incubación con el oligonucleótido M2 sólo generaba bandas de retardo muy minoritarias, tanto en células N2a-*cerbA* como en neuronas. El oligonucleótido M3 no mostraba unión de proteínas nucleares en ninguno de los tipos celulares. El papel preponderante del segundo elemento CRE en la unión de CREB en presencia de Fk queda reforzado por la observación de que los complejos proteicos formados por la sonda E no aparecen cuando se incluye un exceso de oligonucleótido M1

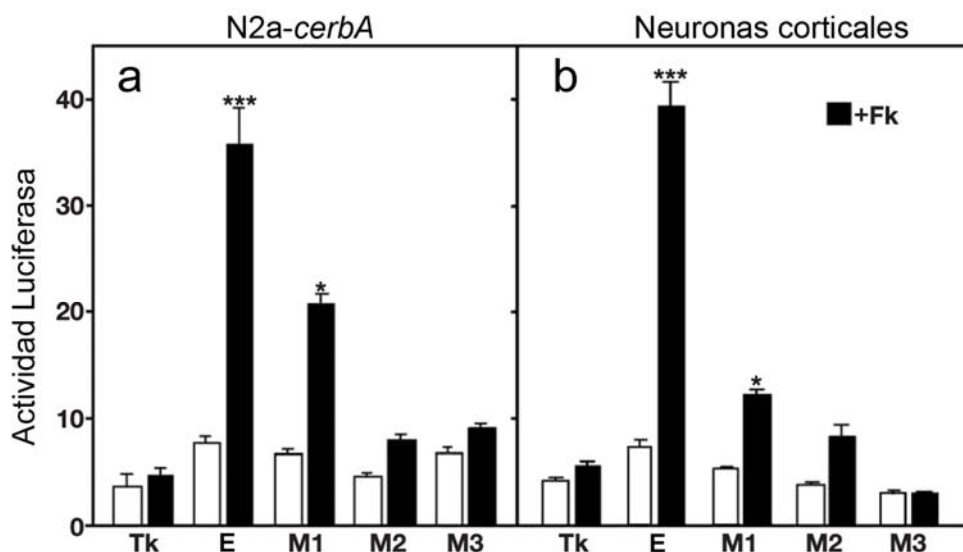


**Figura 32. Distinta capacidad de unión de CREB a los elementos trkB-CREs en presencia de Fk.** Se realizaron ensayos de EMSA con extractos nucleares de cultivos primarios de neuronas corticales (a), o de células N2a-*cerbA* estimuladas 4h con Fk. Los oligonucleótidos competidores no marcados presentaban los elementos trkB-CREs nativos (E), o mutaciones en el primer elemento (M1), el segundo (M2) o ambos elementos (M3). Se añadieron en un exceso molar de 100 veces respecto al oligonucleótido marcado que contenía los elementos nativos trkB-CREs. Las bandas de retardo específico aparecen marcadas con flechas y puntas de flecha. Los complejos no específicos se marcaron como “cne”, y la sonda libre como “sl”.

en el ensayo (Fig. 32). Finalmente, estudiamos si habría un paralelismo entre la capacidad de cada elemento CRE de unir proteínas nucleares con su funcionalidad para promover transactivación. Para ello utilizamos los plásmidos que tenían clonados dichos oligonucleótidos en el vector pTK-Luc, y evaluamos el efecto que producía la Fk sobre

su activación, tanto en células N2a-*cerbA* (Fig. 33a) como en neuronas corticales (Fig. 33b). La mutación en el primer elemento CRE disminuía significativamente la actividad del reportero, mientras que la mutación del segundo elemento CRE abrogaba el efecto dependiente de Fk. Todos estos datos demuestran que el segundo elemento CRE,





**Figura 33. El segundo elemento trkB-CRE es capaz de transactivar un promotor heterólogo de manera dependiente de Fk.** Células N2a-cerbaA (a), y neuronas corticales (b) fueron transfectadas con el vector reportero pTK-Luc en el que se clonó un oligonucleótido conteniendo los elementos nativos trkB-CREs (E), o mutaciones en el primer elemento (M1), el segundo (M2) o ambos elementos (M3), y el vector pSV40-LacZ. Después de la transfección, las células fueron estimuladas con Fk durante 6h y se procedió a determinar las actividades luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa. Los datos representan la media  $\pm$  D.E de los valores de la actividad luciferasa normalizada con la actividad  $\beta$ -galactosidasa de tres experimentos diferentes. La diferencia estadística entre los datos de células tratadas y control se determinó mediante la prueba t de Student (\* $p$ <0.05, \*\*\* $p$ <0.001).

presente en el promotor P2 del gen *trkB*, juega un papel crucial en la estimulación transcripcional en respuesta a la activación de la vía AMPc/PKA/CREB, tanto en la línea celular N2a-cerbaA como en cultivos primarios de neuronas corticales.

#### 4.3. Estudio de la regulación del receptor de neurotrofinas TrkB en excitotoxicidad: implicación en el proceso de muerte neuronal.

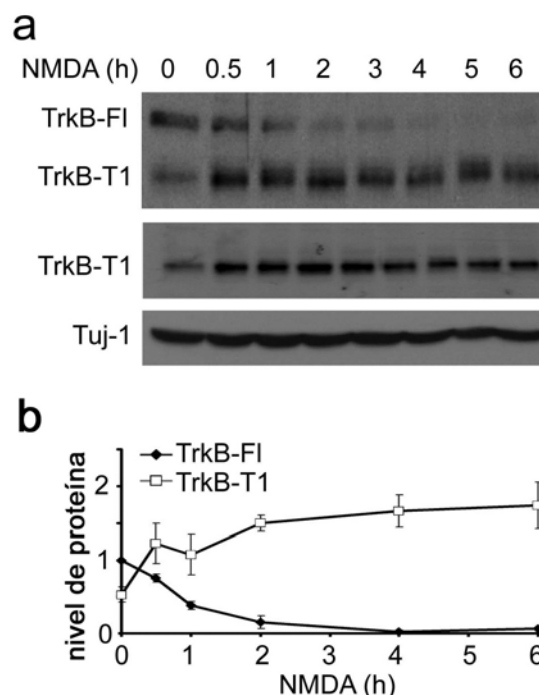
Las rutas de señalización dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  juegan un papel fundamental en numerosos

cambios adaptativos que tienen lugar en el sistema nervioso. Así, el flujo de este ión a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L es un potente activador de CREB, lo cual produce el incremento de la transcripción de numerosos genes, entre ellos los que codifican para BDNF y TrkB (Tao et al., 1998); (Kingsbury et al., 2003). Igualmente, la estimulación sináptica de los receptores NMDA, canales iónicos de elevada permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , produce la activación de la transcripción de genes dependientes de CREB (Hardingham et al., 2002). Sin embargo, la activación de los receptores de NMDA extrasinápticos da lugar a la defosforilación de CREB, la inactivación

de la transcripción de BDNF y la muerte neuronal por excitotoxicidad. Así pues, y teniendo en cuenta los resultados anteriores (sección 4.2.), decidimos estudiar si la expresión de TrkB pudiera estar modificada en los procesos de excitotoxicidad que ocurren tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.

#### 4.3.1 Cambio en la expresión de las isoformas de TrkB en cultivos primarios de neuronas corticales en situación de excitotoxicidad.

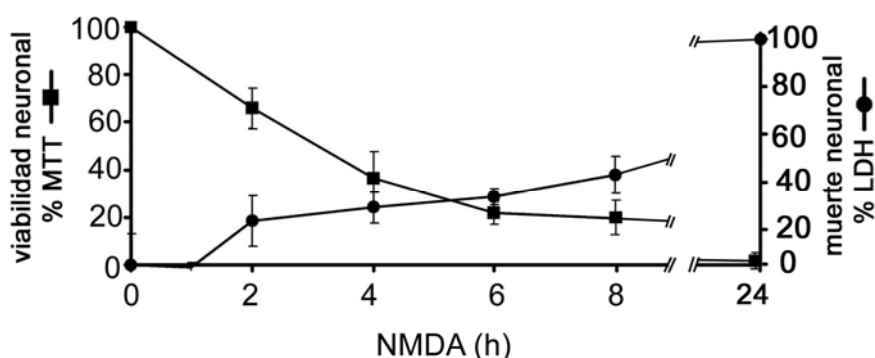
En nuestro trabajo hemos utilizado un modelo de excitotoxicidad *in vitro*, consistente en la estimulación de los receptores de NMDA en cultivos primarios de neuronas corticales de 14 DIV con dosis altas (100 $\mu$ M) de su agonista. Cuando analizamos mediante WB extractos proteicos obtenidos de estos cultivos, utilizando anticuerpos anti-pan-TrkB, anti-TrkB-T1 y un anticuerpo contra la proteína neuroespecífica Tuj1 ( $\beta$ -III-Tubulina), observamos un marcado descenso de los niveles de TrkB-FI y un aumento de los niveles de TrkB-T1 (Fig. 34a). La cuantificación de tres experimentos independientes muestra que, comparados con los de cultivos sin tratar, los niveles de TrkB-FI se redujeron en un 60% después de 1h de tratamiento con NMDA, llegando a ser prácticamente indetectables después de 4h.



**Figura 34. NMDA promueve el cambio de expresión de las isoformas de TrkB en cultivos primarios de neuronas corticales.** (a) Cultivos primarios de neuronas corticales de 14 días de cultivo fueron estimulados durante diferentes periodos de tiempo con NMDA (100 $\mu$ M) y glicina (10 $\mu$ M). Los lisados totales fueron analizados por WB usando anticuerpos anti-pan-TrkB, anti-TrkB-T1, y anti-Tuj-1 ( $\beta$ -III-Tubulina). (b) Cuantificación de tres experimentos como en (a), donde se muestra que la expresión de TrkB-T1 se incrementa rápidamente por tratamiento con NMDA, mientras que la expresión de TrkB-FI disminuye tras la estimulación. Los datos representan la media  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes y se presentan como valores relativos respecto a los de TrkB-FI en las células sin tratar.

Por el contrario, los niveles de TrkB-T1 aumentaron hasta 2 veces después de 30min de tratamiento, incrementándose hasta en 4 veces después de 6h de tratamiento (Fig. 34b). Confirmamos la situación de excitotoxicidad inducida en nuestros cultivos por el tratamiento con NMDA mediante ensayos de

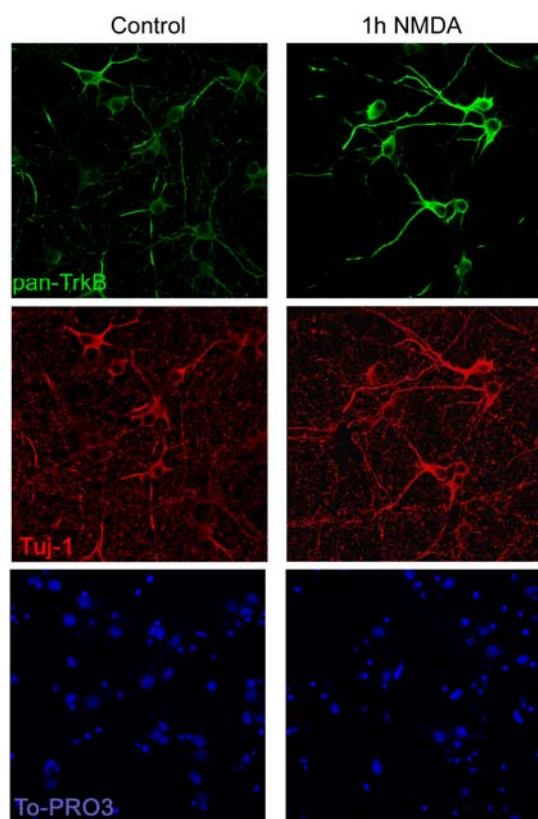




**Figura 35. Reducción de la viabilidad neuronal dependiente del tiempo de tratamiento con NMDA.** La viabilidad y la muerte neuronal de cultivos primarios de neuronas corticales de 14DIV, tratados con NMDA 100 $\mu$ M durante diferentes periodos de tiempo, fueron ensayadas por los métodos de MTT y LDH, respectivamente. Los datos representan la media  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes.

viabilidad neuronal, utilizando MTT para estimar la actividad mitocondrial, o de muerte neuronal, en los que medimos la actividad del enzima LDH citoplásmica que se libera al medio como consecuencia de la pérdida de la integridad de la membrana celular. Cuando medimos la viabilidad neuronal de nuestros cultivos por el ensayo de MTT (Fig. 35), observamos una disminución en la actividad mitocondrial de un 35% y de más de un 80% después de 2h y 6h de tratamiento con NMDA (100 $\mu$ M), respectivamente. Asimismo, la actividad del enzima LDH presente en el medio (Fig. 35) aumentó un 20% y un 40% después de 2h y 8h de tratamiento con NMDA, respectivamente, lo que indicaba que a pesar de que la actividad mitocondrial se veía rápidamente afectada por el tratamiento con NMDA, la integridad de las membranas celulares se pierde más lentamente después del tratamiento. Puesto que los cultivos utilizados

en estos experimentos son mixtos y están formados por neuronas y células gliales, fundamentalmente astrocitos, que expresan la forma truncada de TrkB, era importante determinar en que población celular tenían lugar los cambios observados en la expresión de dicha proteína. Para ello, a continuación, realizamos ensayos de inmunofluorescencia usando anticuerpos anti-pan-TrkB y anti-Tuj1 ( $\beta$ -III-Tubulina), así como To-PRO3 para la tinción nuclear. Observamos un aumento de la inmunoreactividad de TrkB específicamente en los cultivos de neuronas tratados 1h con NMDA, en comparación con las células sin tratar (Fig. 36). La tinción de los núcleos con TO-PRO3 puso de manifiesto la presencia de células no neuronales en los cultivos, expresando niveles moderados de TrkB que no eran alterados por el tratamiento con NMDA. En conjunto, estos experimentos demuestran la alteración en la expresión de las



**Figura 36. Aumento de la expresión de TrkB específicamente en neuronas por NMDA.** Cultivos primarios fueron tratados durante 1h con NMDA (100 $\mu$ M), antes de ser fijadas para ser analizadas por inmunocitoquímica utilizando anticuerpos anti-pan-TrkB (verde) y anti-Tuj1 (rojo). Los núcleos celulares teñidos con To-PRO3 (azul) denotan la presencia de células no neuronales en los cultivos. Las imágenes corresponden a una sección obtenida por microscopía confocal.

isoformas de TrkB específicamente en neuronas en asociación al proceso de excitotoxicidad.

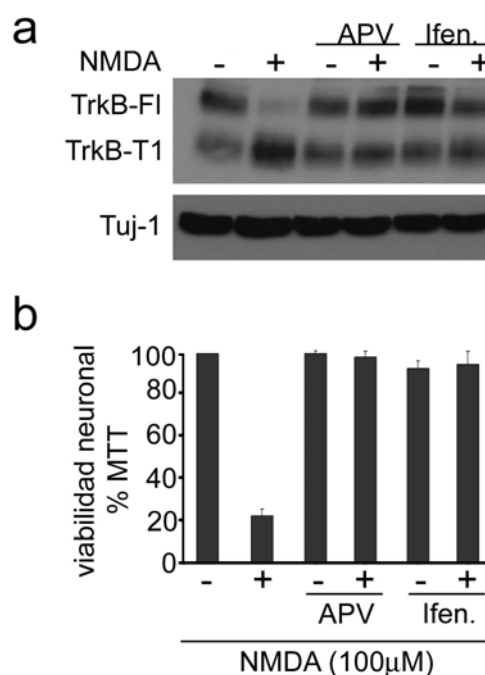
#### 4.3.2 Mecanismo de regulación de la expresión de TrkB en el modelo celular de excitotoxicidad.

Dado que el tratamiento con NMDA permite la activación tanto de los receptores sinápticos, en los que las subunidades NR2 mayoritarias son las de tipo NR2A, como de los extrasinápticos, formados fundamentalmente por subunidades NR2B (Hardingham et al., 2002), decidimos caracterizar que tipo de receptores estaban implicados en la regulación de las isoformas de TrkB. Para ello, previamente a la adición de NMDA, tratamos los cultivos durante 15min con un antagonista genérico de los receptores NMDA, APV (100 $\mu$ M), o con un inhibidor selectivo de los receptores formados por subunidades NR2B, Ifenprodil (10 $\mu$ M), analizando a continuación los extractos proteicos mediante WB. Ambos compuestos impidieron el efecto del NMDA sobre la expresión de TrkB (Fig. 37a), indicando que el proceso de regulación es debido a una sobreactivación de los receptores NMDA formados por subunidades NR2B. La medida de la viabilidad neuronal con el ensayo de MTT permitió comprobar que el tratamiento con APV o Ifenprodil protegía a las neuronas de la muerte inducida por NMDA (Fig. 37b). Con objeto de caracterizar con mayor detalle el mecanismo de regulación de la expresión de TrkB asociado con excitotoxicidad, analizamos los niveles de ARNm de cada isoforma mediante ensayos de qRT-PCR con oligonucleótidos específicos para TrkB-F1 y TrkB-T1. En estos ensayos observamos un

aumento de hasta 2 veces en el nivel de los transcritos específicos de TrkB-T1 después de 1h de tratamiento, llegando a ser éstos de 3 y 4 veces después de 4h y 6h de incubación con NMDA (100µM), respectivamente (Fig. 38a). Por el contrario, los niveles de TrkB-FI disminuyeron un 50% después de 1h de tratamiento, y fueron prácticamente indetectables después de 6h de estimulación (Fig. 38a). El pretratamiento con APV o Ifenprodil impidió el efecto del NMDA sobre los niveles de ARNm de ambas isoformas (Fig. 38b). Todos estos datos parecen indicar que el tratamiento con NMDA en condiciones de excitotoxicidad induce en cultivos primarios de neuronas corticales, a través de la activación de receptores formados por subunidades NR2B, un cambio rápido en los niveles de ARNm codificantes para cada una de las isoformas de TrkB que justifican los cambios observados para estas proteínas.

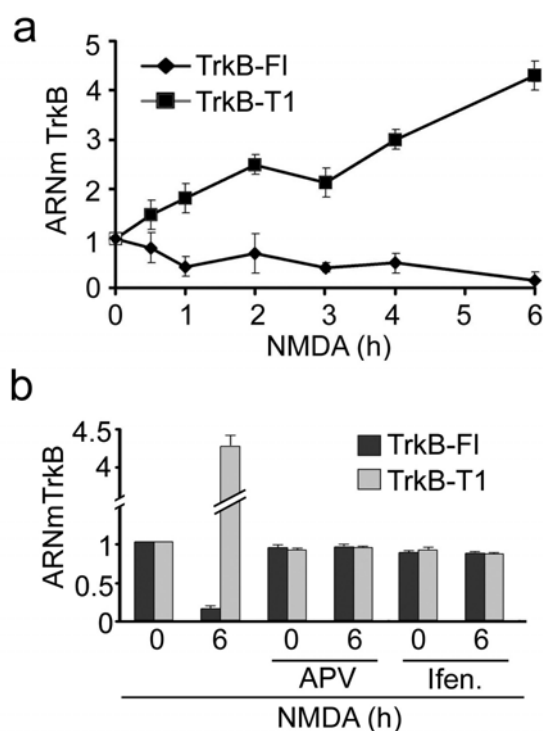
#### 4.3.3 Asociación entre la muerte neuronal por excitotoxicidad y los cambios en la expresión de las isoformas del receptor de neurotrofinas TrkB.

El hecho de que se produjera un cambio de la expresión de las isoformas del gen *trkB* tras el tratamiento con NMDA siguiendo un curso temporal similar al de la pérdida de viabilidad neuronal, nos hizo plantearnos una serie de



**Figura 37. La activación excitotóxica de los receptores NMDA formados por subunidades NR2B, promueve el cambio de expresión de las isoformas de TrkB en neuronas corticales.** (a) Cultivos primarios de neuronas corticales fueron pretratados durante 15min con un antagonista de los receptores de NMDA, APV (100µM), o el inhibidor selectivo de los receptores formados por subunidades NR2B Ifenprodil (Ifen.) (10µM) y, posteriormente, estimulados con NMDA (100µM) durante 6h. Los extractos proteicos fueron analizados mediante WB usando anticuerpos anti-pan-TrkB, y anti Tuj-1. (b) La viabilidad neuronal de cultivos tratados como en (a) fue ensayada mediante el método del MTT. Los datos representan la media ± D.E de tres experimentos independientes.

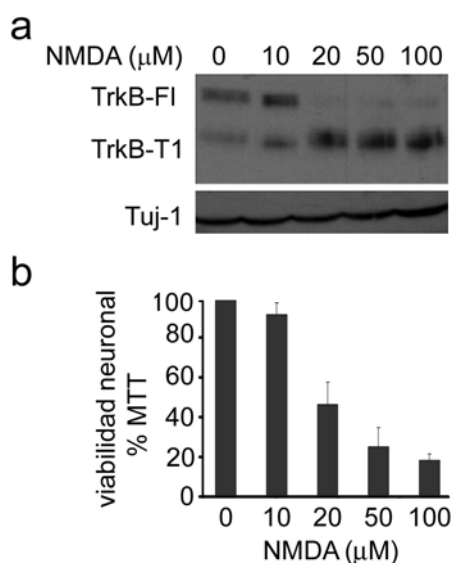
experimentos para confirmar la asociación de ambos fenómenos. Para ello, tratamos los cultivos de neuronas corticales durante 6h con distintas concentraciones de NMDA, desde 1µM a 100µM, y analizamos la expresión de TrkB mediante WB y la viabilidad neuronal mediante el ensayo de MTT. Únicamente



**Figura 38. Regulación por NMDA de los niveles de ARNm de las isoformas de TrkB en neuronas corticales.** (a) ARN total (2 $\mu$ g) procedente de neuronas corticales tratadas con NMDA (100 $\mu$ M) durante diferentes tiempos, se utilizó para generar ADNc y cuantificar los niveles de ARNm para TrkB-T1, TrkB-FI, y GAPDH mediante qRT-PCR. Se emplearon oligonucleótidos específicos para detectar cada transcrito. En la cuantificación se usaron los niveles de ARNm de GAPDH para la normalización de los resultados (b) El ARN total procedente de cultivos primarios de neuronas corticales de 14DIV que fueron pretratadas durante 15min con APV (100 $\mu$ M), Ifenprodil (Ifen.) (10 $\mu$ M) o solvente, y posteriormente estimulados con NMDA (100 $\mu$ M), se analizó por qRT-PCR para determinar los niveles de los transcritos de TrkB-FI, TrkB-T1 y GAPDH. Los resultados muestran la media  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes y se presentan como valores relativos respecto a las células sin tratar.

observamos un cambio en la expresión de las isoformas de TrkB a concentraciones de NMDA superiores a 10 $\mu$ M (Fig. 39a),

consideradas en la literatura como excitotóxicas. En efecto, la medida de la viabilidad neuronal (Fig. 39b) mostró una buena correlación con los resultados anteriores, demostrando que la regulación de las isoformas de TrkB requería la estimulación excitotóxica de los receptores de NMDA. Además, observamos que a altas concentraciones de NMDA (100 $\mu$ M) se producía la regulación de la expresión de TrkB de manera irreversible, tras una breve estimulación de los receptores de NMDA. Así, la estimulación de las neuronas durante 30min con NMDA, seguida por el bloqueo de estos receptores con el antagonista APV hasta completar 6h de tratamiento, dio lugar a una modificación de la expresión de TrkB similar a la inducida por 6h de estimulación continuada con NMDA (Fig. 40a). Estas breves estimulaciones con NMDA, tal y como se demostró previamente (Hartley and Choi, 1989), fueron suficientes para inducir de forma irreversible el proceso de muerte neuronal (Fig. 40b). Con estos datos, concluimos que la regulación de la expresión de las isoformas del receptor de neurotrofinas TrkB, al igual que ocurre con la muerte neuronal, es inducida tras una breve estimulación con concentraciones excitotóxicas de NMDA de los receptores compuestos por subunidades NR2B, tras la cual los efectos no pueden ser bloqueados o revertidos por el uso de antagonistas.

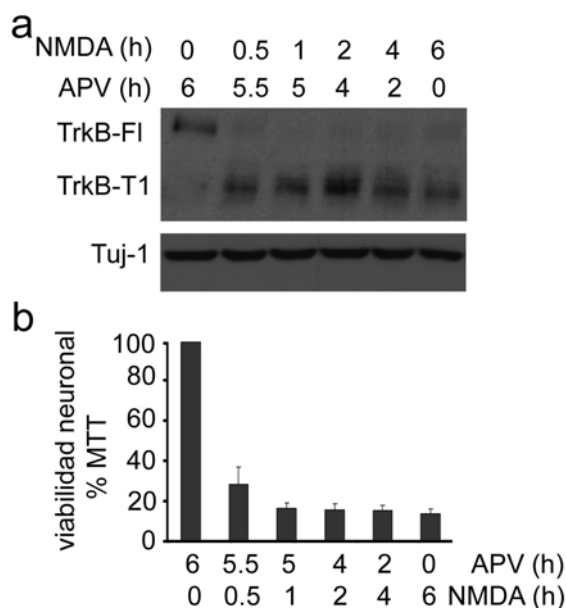


**Figura 39. Necesidad de concentraciones de NMDA excitotóxicas para la regulación de la expresión de TrkB.** (a) Cultivos primarios de neuronas fueron estimulados durante 6h con glicina (10 $\mu\text{M}$ ) y NMDA a distintas concentraciones. Los niveles de las isoformas de TrkB y Tuj-1 se determinaron por ensayos de WB. (b) La viabilidad neuronal de cultivos tratados como en (a) fue analizada mediante ensayos de MTT. Los datos representan la media  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes.

#### 4.3.4 Contribución de la regulación de la expresión de TrkB a la muerte neuronal por excitotoxicidad.

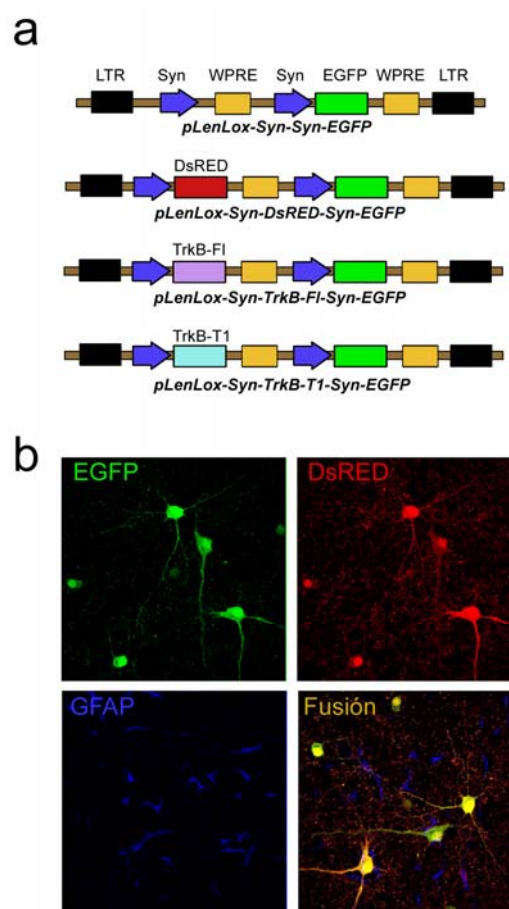
La implicación del receptor TrkB-FI en la supervivencia neuronal, el papel antagónico que juega el receptor TrkB-T1 frente a TrkB-FI, así como la rápida modificación de expresión de ambas isoformas que observamos en cultivos neuronales tras el tratamiento con altas concentraciones de NMDA, nos hicieron plantearnos la

posibilidad de que este cambio pudiera estar implicado en el fenómeno de muerte neuronal dependiente de excitotoxicidad. Con objeto de confirmar esta hipótesis, realizamos experimentos de sobreexpresión de las isoformas TrkB-FI y TrkB-T1 en cultivos de neuronas, y caracterizamos su efecto sobre la viabilidad en situación normal o de excitotoxicidad. Dada la naturaleza mixta de los cultivos primarios utilizados, decidimos utilizar un sistema lentiviral que permite la transducción eficiente de genes en neuronas (Gascón, 2007). Para ello, los ADNc correspondientes a TrkB-FI y TrkB-T1 fueron clonados en el vector pLenLox-Syn-Syn-EGFP (Fig. 41a), obteniéndose los virus LV-Syn-TrkB-FI-Syn-EGFP y LV-Syn-TrkB-T1-Syn-EGFP, que permiten la coexpresión de cada una de las isoformas junto con la proteína EGFP, utilizada como reportera. La especificidad del sistema utilizado para la expresión neuroespecífica de proteínas se ilustra en la figura 41b, donde la infección de cultivos mixtos con el virus LV-Syn-DsRED-Syn-EGFP (Gascón, 2007) da lugar a la coexpresión eficiente de las proteínas fluorescentes EGFP y DsRED únicamente en neuronas, quedando ésta excluida de las células gliales que expresan GFAP. A continuación utilizamos los virus LV-Syn-TrkB-FI-Syn-EGFP y LV-Syn-TrkB-T1-Syn-EGFP para infectar cultivos primarios y estudiar el efecto de la sobreexpresión de las



**Figura 40. Cambio irreversible de la expresión de las isoformas de TrkB por tratamiento con NMDA.** (a) Cultivos primarios de neuronas corticales fueron tratados con NMDA (100 $\mu$ M) los tiempos indicados y, posteriormente, se añadió APV (100 $\mu$ M) hasta completar 6h de tratamiento total. Los niveles de las isoformas de TrkB, y Tuj-1 se determinaron mediante ensayos de WB. (b) La viabilidad neuronal de cultivos tratados como en (a) fue analizada mediante ensayos de MTT. Los datos representan la media  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes.

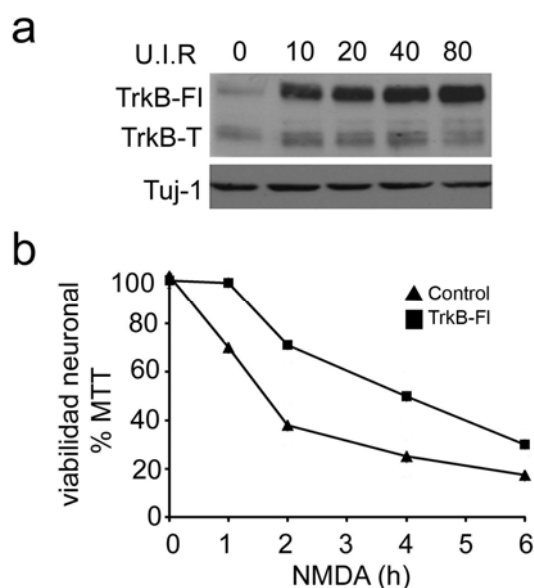
isoformas de TrkB sobre la viabilidad neuronal, tanto en situación normal como tras la estimulación excitotóxica. La comparación mediante WB de cultivos infectados y sin infectar, permitió confirmar la expresión de los receptores TrkB-FI (Fig. 42a) y TrkB-T1 (Fig. 43a). Decidimos observar el efecto que tendría el tratamiento con NMDA (100 $\mu$ M) en células transducidas con los virus LV-Syn-TrkB-FI-Syn-EGFP y LV-Syn-TrkB-T1-Syn-EGFP. Comprobamos que la expresión de TrkB-FI mantenía la viabilidad neuronal en un



**Figura 41. Expresión neuroespecífica de proteínas mediante el uso de lentivirus.** (a) Esquema de los vectores lentivirales utilizados para la sobreexpresión neuroespecífica de las proteínas EGFP, DsRED, TrkB-FI y TrkB-T1. Se caracterizan por presentar dos regiones LTR (*Long Term Repeat*), dos secuencias promotoras del gen neuroespecífico sinapsina (Zhuang et al.) y dos elementos estabilizadores de la transcripción WPRE. (b) Cultivos primarios de neuronas corticales (7DIV) fueron infectados con el lentivirus LV-Syn-DsRED-Syn-EGFP. Las células fueron fijadas y permeabilizadas a 14 DIV para ser analizadas por inmunocitoquímica usando anticuerpos anti-GFAP (azul). Las proteínas DsRED y EGFP se visualizaron por su fluorescencia directa. Las imágenes corresponden a una sección obtenida por microscopía confocal.

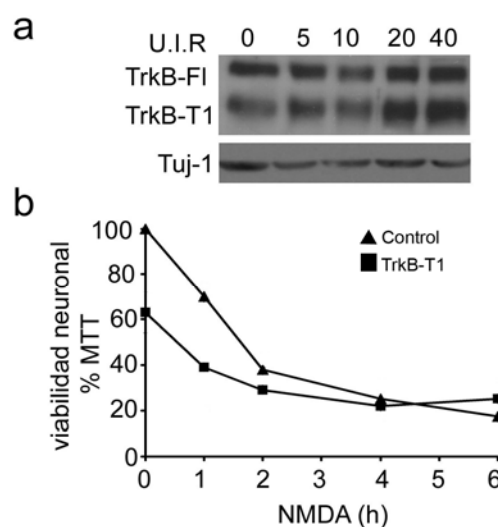
98% después de 1h de tratamiento (Fig. 42b) y





**Figura 42. La expresión exógena de TrkB-FI protege de la muerte inducida por NMDA.** (a) Cultivos primarios de neuronas corticales (7DIV) fueron infectados con distintas concentraciones de lentivirus Syn-TrkB-FI-Syn-EGFP. Las células fueron lisadas después de 14DIV y analizadas por WB usando anticuerpo anti-pan-TrkB y anti-Tuj-1. (b) La viabilidad de cultivos neuronales infectados con 10 U.I.R./ml de lentivirus Syn-DsRED-Syn-EGFP (Control), o virus Syn-TrkB-FI-Syn-EGFP (TrkB-FI), y tratados con NMDA (100μM) durante diferentes períodos de tiempo 7 días después de la infección, fue analizada por el método del MTT. Los datos representan la media de dos experimentos independientes.

de un 50% tras 4h, frente al 70%, y 25%, respectivamente, que presentaban las neuronas control infectadas con el virus que expresaba las proteínas DsRED y EGFP. Sin embargo, al cabo de 6h, la viabilidad neuronal llegó prácticamente a igualarse en ambos casos. Por el contrario, observamos que la expresión de TrkB-T1 producía una reducción de la viabilidad de los cultivos de un 35%, aun sin haber sido tratados con NMDA (Fig. 43b), y



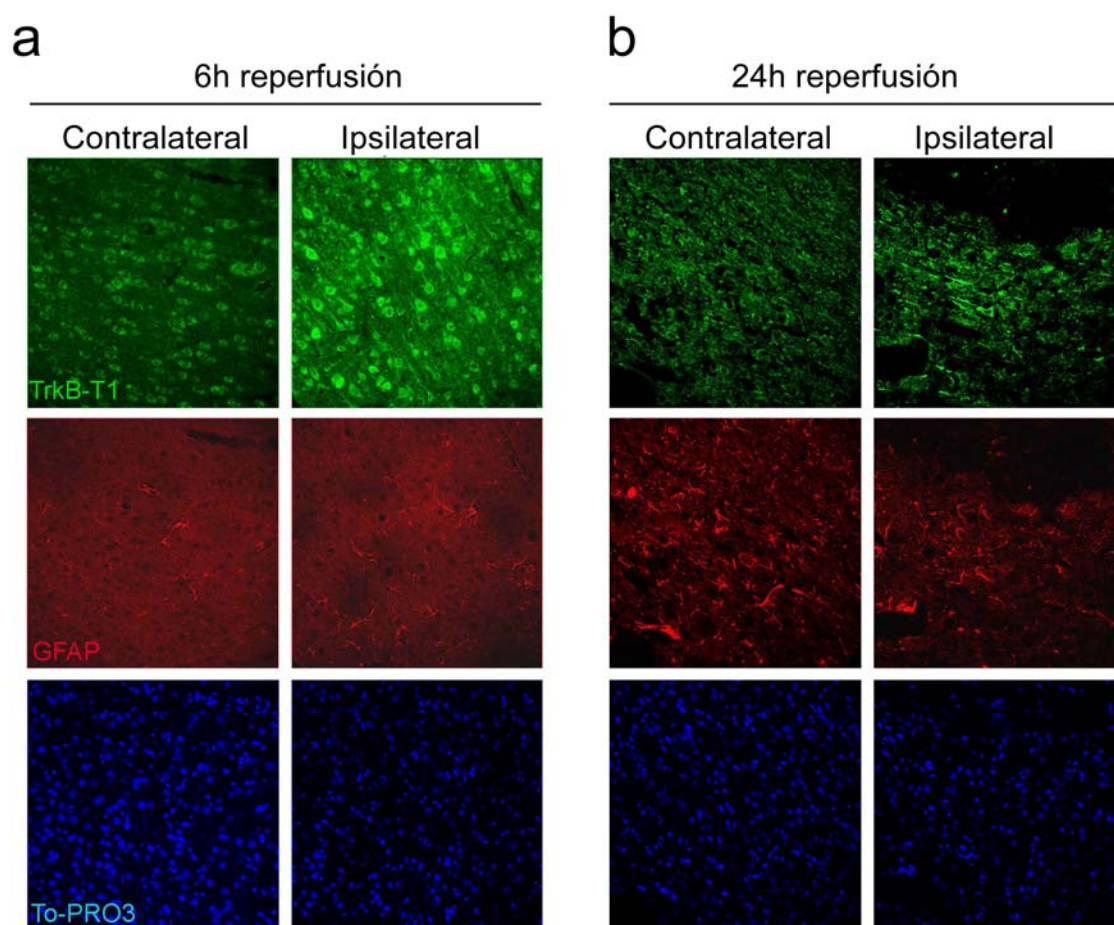
**Figura 43. La expresión exógena de TrkB-T1 induce muerte neuronal.** (a) Cultivos primarios de neuronas corticales (7DIV) fueron infectados con distintas concentraciones de lentivirus Syn-TrkB-T1-Syn-EGFP. Las células fueron lisadas después de 14DIV y analizadas por WB usando anticuerpo anti-pan-TrkB, y anti-Tuj-1. (b) La viabilidad de cultivos neuronales infectados con 10 U.I.R./ml de lentivirus Syn-DsRED-Syn-EGFP (Control) o Syn-TrkB-T1-Syn-EGFP (TrkB-T1) a 7DIV, y tratados con NMDA (100μM) durante diferentes períodos de tiempo a 14DIV, fue analizada por el método del MTT. Los datos representan la media de dos experimentos independientes.

éstos eran más sensibles al NMDA, al menos a tiempos tempranos de tratamiento. Estos datos sugieren que la sobreexpresión de TrkB-T1 y la pérdida de TrkB-FI, inducidas por la sobreestimulación de los receptores de NMDA, es uno de los factores implicados en la muerte neuronal por excitotoxicidad.

#### 4.3.5 Inducción de TrkB-T1 en neuronas corticales en un modelo de excitotoxicidad in vivo.

La excitotoxicidad inducida por la sobre-activación de los receptores de NMDA es responsable de la degeneración neuronal observada en diversas patologías, incluyendo la isquemia cerebral (Choi et al., 1988), la enfermedad de Huntington (Young et al., 1988), y la enfermedad de Alzheimer (Greenamyre et al., 1988). Una vez que

observamos la sobre-expresión de TrkB-T1 inducida por NMDA, en los cultivos neuronales, nos preguntamos si esta regulación podría ocurrir también en un modelo animal de isquemia cerebral. Para abordar este objetivo estudiamos la expresión de TrkB-T1 en rodajas transversales de cerebros isquémicos después de 6h y 24h de



**Figura 44. Aumento de TrkB-T1 en isquemia cerebral transitoria.** Secciones coronales de un cerebro de rata adulta sometido a 1h de oclusión de la arteria media cerebral y 6h (a) ó 24h (b) de reperusión, inmunoteñidas con un anticuerpo anti-TrkB-T1 (verde) y anti-GFAP (rojo), y observadas por microscopía confocal. Los núcleos celulares se tiñeron con TO-PRO3 (azul). a). La expresión de TrkB-T1 se incrementa notablemente en neuronas corticales del tejido isquémico (ipsilateral). No se observa colocalización de TrkB-T1 y GFAP. b) Disminución de la expresión de TrkB-T1 en el núcleo del infarto y aumento en algunas neuronas que permanecen en el área del borde del infarto después de 24h de reperusión. Se aprecia un incremento de la expresión de GFAP con el tiempo de reperusión en el borde externo del infarto.



reperfusión (Fig. 44). Como muestra la Figura 44a, la mayoría de las células inmunoteñidas con el anticuerpo frente a TrkB-T1 presentan características morfológicas de neuronas piramidales. Después de 6h de reperfusión, observamos un incremento significativo en la expresión de TrkB-T1 en el territorio de la ACM ocluida (o ipsilateral). No se observa expresión de TrkB-T en astrocitos, como refleja la doble inmunotinción de TrkB-T1 y GFAP. Después de 24h de reperfusión (Fig. 44b), no se aprecia expresión de TrkB-T1 en el núcleo del infarto, mientras que las neuronas con morfología triangular que permanecen en el área del borde del infarto, identificado por secciones adyacentes teñidas con violeta de cresilo (datos no mostrados), expresan TrkB-T1. Por otro lado, la expresión de GFAP incrementa con el tiempo de reperfusión, mostrándose más intensa en el borde externo del núcleo del infarto y bordeando a aquellas neuronas que expresan TrkB-T1.

## **5. Discusión**

En el presente estudio demostramos que la activación del factor de transcripción CREB promueve la expresión del gen *trkB*, tanto en cultivos primarios de astrocitos como de neuronas corticales. Esta regulación, depende de los elementos *trkB*-CREs localizados en el promotor P2, pero no del P1, ambos presentes en la región 5' de este gen (Baretino et al., 1999).

En la búsqueda de nuevos mecanismos de control de la expresión de *trkB*, decidimos estudiar si en neuronas se producía una inhibición de la transcripción de éste en las condiciones descritas por Hardingham y colaboradores (Hardingham et al., 2002). Ellos observaron que se produce una disminución de la expresión de genes dependientes de CREB, como consecuencia de la sobre-estimulación de los receptores de glutamato tipo NMDA. Si bien encontramos que la sobre-activación de estos receptores produce la desaparición de los niveles de ARNm y proteína de TrkB-FI en neuronas, también observamos que en éstas se incrementan los niveles del receptor truncado TrkB-T1, produciéndose así un cambio de expresión de las isoformas de TrkB. Además observamos que esta regulación dual está directamente relacionada con la muerte neuronal por excitotoxicidad. De acuerdo con estos resultados, encontramos que en un modelo *in vivo* de isquemia cerebral en la rata adulta, se produce un incremento del

receptor TrkB-T1 en neuronas corticales, lo que sugiere que en estas condiciones patológicas, se está produciendo la inhibición de las rutas de supervivencia neuronal dependientes de TrkB-FI.

### 5.1 Regulación de la expresión de las isoformas de TrkB.

El patrón de expresión de las isoformas completa y truncadas del receptor TrkB es diferente. TrkB-FI se expresa sólo en neuronas (Klein et al., 1990b); (Middlemas et al., 1991), donde ejerce un papel fundamental en la activación de señales de supervivencia dependientes de neurotrofinas. Por el contrario, las isoformas TrkB-T se expresan de forma mayoritaria, pero no exclusiva, en las células gliales (revisado en Barbacid 1994). El tipo de isoforma que se genera a partir de un determinado gen está controlado por la maquinaria de procesamiento alternativo, y ésta puede estarlo por la diferente composición de los factores que la constituyen, por la presencia de distintos factores co-reguladores de la transcripción, el uso alternativo de promotores, la velocidad de transcripción, la estabilidad del ARNm o la vida media de la proteína (revisado en Kornblihtt, 2004 #2783). En nuestro laboratorio se demostró que la región 5' del gen *trkB* confiere, en diferentes tipos

celulares, especificidad de activación de su transcripción (Barettino et al., 1999). Así, al transfectar células de neuroblastoma N2a con un vector que contenía esta secuencia 5' dirigiendo la transcripción de la proteína CAT, se detectaba mayor actividad de este enzima, en estas células, que en las células no neuronales COS-7 transfectadas con la misma construcción. Esta región 5', sin embargo, no determina el tipo de isoforma generada en condiciones basales, ya que los ARNm tanto de las isoformas completa y truncadas de TrkB, pueden transcribirse a partir de cualquiera de los promotores P1 y P2 localizados en este gen. Mientras que nosotros demostramos en este trabajo que el aumento citoplásmico de AMPc promueve en cultivos neuronales la expresión de las isoformas TrkB-FI y TrkB-T, el grupo del Dr. Krueger (Kingsbury et al., 2003) observó que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por tratamiento con KCl origina, únicamente, el aumento de la expresión de TrkB-FI. En ambos casos ocurre, aunque por vías de señalización diferentes, la fosforilación de CREB, la unión de este factor de transcripción a los elementos trkB-CREs y el aumento de la transcripción de *trkB* a partir del promotor P2. Por tanto, las diferencias entre nuestros resultados y los descritos por Kingsbury y colaboradores (Kingsbury et al., 2003), son consecuencia del diferente estímulo utilizado para la activación de la transcripción de *trkB*.

Aunque ninguno de los dos grupos caracterizamos el porqué de este diferente patrón de expresión, éste no es consecuencia del uso de un promotor alternativo. En condiciones de excitotoxicidad neuronal, observamos que se favorece el aumento de la expresión de TrkB-T1 a costa de la desaparición de TrkB-FI. Este incremento de TrkB-T1 puede ser debido a la unión de algún factor de transcripción, activando en estas condiciones la expresión de *trkB* a partir de los promotores P1, P2 o a algún otro promotor alternativo. De hecho, *in silico* detectamos la presencia de tres posibles elementos reguladores de unión para el factor de transcripción inducido por hipoxia (HIF), (Fig. 7). Tampoco podemos descartar la posibilidad de que en estas condiciones se produjera el uso de un nuevo promotor alternativo, aún no caracterizado, que controlaría únicamente la expresión de TrkB-T1, mientras que la disminución de TrkB-FI se debería a la bajada de la transcripción dependiente de P1 ó P2. Un ejemplo del uso de promotores alternativos para controlar las isoformas generadas a partir de un gen es el descrito por Viegas y colaboradores respecto al gen *bcl-X* (Viegas et al., 2004). Este grupo observó que, en células epiteliales de mamífero, se promovía la expresión de la isoforma Bcl-X<sub>L</sub> por activación de la transcripción a partir de un promotor, el cuál únicamente actuaba como tal en presencia de

hormonas esteroideas. La regulación de TrkB en excitotoxicidad neuronal también podría ser consecuencia de un estímulo que originase un cambio en la maquinaria de procesamiento alternativo, como ocurre en la expresión del canal iónico de potasio tipo BK (Xie and Black, 2001); (Xie et al., 2005). Este grupo observó que estímulos depolarizantes son capaces de inducir en células pituitarias GH3, un cambio en la expresión de las isoformas de dicho canal, que juega un importante papel en el impulso nervioso, demostrando que la activación de la proteína CaMKIV promueve la exclusión de un exón que contiene un elemento denominado STREX. Por contra, la incorporación de este exón se favorecía cuando se inhibía esta kinasa, o cuando se mutaba esa secuencia. Como dijimos anteriormente, los cambios en el procesamiento alternativo también puede ser consecuencia de la remodelación de la cromatina. Un ejemplo es el descrito por el grupo del Dr. Kornblihtt (Fededa et al., 2004) para la regulación del patrón de expresión de las isoformas del gen neuronal NCAM (*Neuronal-cell adhesion molecule*), en el que como consecuencia de un incremento en la acetilación de histonas en la cromatina y una disminución de la velocidad de transcripción, se favorece la inclusión de exones alternativos. En astrocitos observamos que tanto en condiciones basales, como en

aquellas en las que se produce la fosforilación de CREB, la expresión de *trkB* no origina la isoforma completa. Por tanto, la maquinaria de procesamiento alternativo está condicionada para que en este tipo celular no se genere esa isoforma, tal vez porque exista un control específico en las células no neuronales de dicha maquinaria.

## 5.2 Regulación de la expresión de TrkB dependiente de CREB.

En este trabajo demostramos que la expresión de TrkB está regulada por el factor de transcripción CREB de manera dependiente tanto de AMPc como de  $\text{Ca}^{2+}$ . La unión de este factor a los elementos *trkB*-CREs permite la activación de la región promotora P2 y el aumento de los niveles de TrkB. Al igual que ocurre con la activación de CREB por Fk en neuronas y astrocitos, la estimulación con ATP promueve la fosforilación de CREB en la Ser133 con un patrón temporal muy similar. Como ya han descrito diversos autores (Centemeri et al., 1997); (Cornell-Bell and Finkbeiner, 1991); (James and Butt, 2002), la estimulación de astrocitos con concentraciones elevadas de ATP, induce el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior celular al citoplasma. Este proceso requiere la activación de los receptores purinérgicos P2X, presentes en la membrana celular, que

actúan como canales iónicos. Existe otro tipo de receptores purinérgicos activables por ATP, denominados P2Y, y caracterizados por encontrarse acoplados a proteínas G. Estos receptores metabotrópicos son capaces tanto de aumentar los niveles de AMPc y activar rutas dependientes de PKA, como de movilizar el  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares (Fumagalli et al., 2003). La activación de los receptores metabotrópicos, por tanto, no nos habría permitido distinguir si el incremento de TrkB era debido al aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  o de AMPc. A pesar de que las rutas de señalización dependientes de AMPc y  $\text{Ca}^{2+}$  convergen en la activación del factor de transcripción CREB, la fosforilación de éste mediada por  $\text{Ca}^{2+}$ /CaMK requiere múltiples eventos de fosforilación exclusivos, que no se producen por los mecanismos dependientes de AMPc (Kornhauser et al., 2002). Así, PKA promueve la unión del cofactor CBP (*CREB binding protein*) a CREB cuando fosforila a este último en el residuo Ser133, activándose entonces la transcripción génica (Chrivia et al., 1993); (Goldman et al., 1997). Sin embargo, la activación de CREB por estímulos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ /CaMK requiere la fosforilación de dos residuos adicionales, las Ser142 y Ser143 (Kornhauser et al., 2002). En este caso, esta triple fosforilación rompe la interacción de CREB con el cofactor CBP, a pesar de lo cuál se

sigue activando la transcripción mediada por CREB de diversos genes tales como *c-fos* o *bdnf*. Este mecanismo, que no requiere el cofactor CBP, podría constituir la base molecular que diferencia la activación exclusiva de determinados genes por estímulos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ /CREB, y no de AMPc/CREB, como es el caso del gen *bdnf* (Tao et al., 1998). Éste presenta un elemento CRE idéntico al segundo trkB-CRE. Sin embargo, la unión de CREB a dicho elemento sólo es mediada por las vías activadas por  $\text{Ca}^{2+}$ , pero no por aquellas que lo son por AMPc. La aparente doble naturaleza de la unión de CREB al ADN, unión constitutiva frente a unión inducida, parece indicar la existencia de dos tipos de elementos de respuesta CRE: sitios simétricos como la secuencia palindrómica TGACGTCA, que contiene dos elementos CGTCA funcionales, y sitios asimétricos, que contienen una única copia funcional CGTCA (Nichols et al., 1992). Los genes *bdnf* y *somatostatina* contienen elementos CRE simétricos de alta afinidad, a los que CREB se encuentra unido de manera constitutiva (Tao et al., 1998). Por el contrario, los sitios CRE asimétricos, como el presente en los genes *tirosina aminotransferasa* y *proencefalina*, presentan baja afinidad por CREB y requieren la activación de PKA para que se produzca su unión (Nichols et al., 1992). Como los sitios CRE localizados en el

promotor P2 de *trkB* son tanto simétricos (CRE2) como asimétricos (CRE1), es posible que el tratamiento con Fk induzca la unión de CREB al sitio asimétrico, así como su unión al segundo elemento CRE, dado su carácter de elemento simétrico de alta afinidad. Esta hipótesis podría explicar el resultado que obtuvimos en los ensayos de transfección transitoria, tanto en astrocitos (Fig. 23) como en neuronas (Fig. 33). Éstos sugieren que el primer elemento CRE colabora con el segundo, simétrico y de alta afinidad, en la respuesta mediada por PKA, tanto en astrocitos como en neuronas. Esta similitud en ambos tipos celulares se pierde en el caso de la activación de los elementos *trkB*-CREs por  $\text{Ca}^{2+}$ . Kingsbury y colaboradores (Kingsbury et al. 2003) observaron que, en neuronas, la mutación de cualquiera de los elementos *trkB*-CREs implicaba una pérdida de la activación de la transcripción de *trkB* dependiente de estímulos depolarizantes. En astrocitos, por el contrario, nosotros demostramos que es mayoritariamente el segundo elemento el que lleva el peso de la activación transcripcional dependiente de CaMKIV. Un CRE simétrico idéntico al CRE2 de *trkB* es, precisamente, el que permite en neuronas la transcripción del gen *bdnf* por estímulos depolarizantes que producen un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico y la fosforilación de CREB. Sin embargo, este elemento es incapaz de promover la

transcripción dependiente de AMPc/CREB. Estos datos sugieren que la presencia del primer elemento *trkB*-CRE confiere al gen *trkB* la capacidad de ser activado por AMPc, tanto en astrocitos como en neuronas. Habría que realizar un estudio más profundo para poder comprender el diferente papel que podría jugar el segundo elemento *trkB*-CRE en la activación de *trkB* en diferentes tipos celulares en respuesta a  $\text{Ca}^{2+}$ . Nuestro hallazgo de que CREB juega un papel crucial en la activación de la transcripción del gen *trkB*, proporciona las bases moleculares para comprender la enorme correlación mostrada entre el incremento de la fosforilación de CREB, y la estimulación de la expresión de TrkB en diferentes condiciones fisiológicas y experimentales (Merlio et al., 1993); (Condorelli et al., 1994); (Belluardo et al., 1995). Nuestros resultados desvelan por vez primera un mecanismo molecular por el que se produce la regulación de la expresión de TrkB por la vía PKA/CREB, vía que forma parte de la maquinaria celular implicada en el fortalecimiento de las sinapsis. Otto y colaboradores (Otto et al., 2001) observaron que ratones deficientes en la expresión del receptor de tipo I para el polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria, muestran dañada la LTP en las fibras musgosas y el aprendizaje. Este receptor, que se encuentra acoplado a proteínas G, es capaz de aumentar los niveles de AMPc por unión



de su ligando. Dado que TrkB y BDNF se encuentran implicados en el control de ambos procesos, sería interesante estudiar si diferentes receptores acoplados a proteínas G son capaces, o no, de controlar la regulación de la expresión de *trkB* y *bdnf* en neuronas hipocámpales.

### 5.3 Relevancia fisiológica de la regulación de TrkB dependiente de CREB.

Los astrocitos que reaccionan frente a distintas perturbaciones, como un episodio epiléptico o una lesión se denominan reactivos, en contraposición a los astrocitos sin estimular que se conocen como en reposo o quiescentes. No está claro el papel que juega el astrocito durante este proceso conocido como astrogliosis, ya que puede contribuir a la reparación del daño o puede exacerbarlo, según los tiempos que hayan transcurrido desde el inicio de la perturbación y su tipo. La adquisición del estado reactivo por parte del astrocito implica, entre muchos otros fenómenos, un aumento de la inmunoreactividad de la proteína ácida fibrilar glial GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), la adquisición de un aspecto morfológico estrellado, y la secreción de diferentes citoquinas (Acarin et al., 1998). El cambio morfológico que presentan los astrocitos reactivos como consecuencia de la

remodelación del citoesqueleto de actina está mediado por el aumento de los niveles citoplasmáticos de AMPc (Shapiro, 1973). El tratamiento con Fk promueve una morfología similar como consecuencia de la ruptura de las fibras de estrés de actina (Goldman and Abramson, 1990). Este cambio morfológico que observamos en nuestros cultivos al estimularlos con Fk (Fig. 8), sugiere la adquisición del estado reactivo en dichas condiciones. El AMPc es capaz de promover la activación de las células astrogliales (Lindholm et al., 1994). De la misma manera, los niveles altos de ATP como los que se producen en situaciones de daño cerebral, son capaces de promover reactividad glial por activación de los receptores purinérgicos (Ralevic et al., 1997); (James and Butt, 2002). Nuestro modelo *in vitro*, al usar altas concentraciones de ATP (1mM), podría asemejarse a esta situación. Por tanto, el aumento de TrkB-T1 en astrocitos en respuesta al aumento de AMPc o  $\text{Ca}^{2+}$  que hemos observado, podría ser un fenómeno importante en la respuesta del cerebro a diferentes estímulos, incluyendo distintos daños cerebrales. En este sentido, es importante recordar que el receptor truncado juega un papel distinto en neuronas y en astrocitos. En las primeras, el receptor TrkB-T1 antagoniza los efectos de TrkB-Fl, impidiendo las señales de supervivencia neuronal dependientes de la unión de sus

ligandos (Fryer et al., 1997); (Haapasalo et al., 2001). En astrocitos su función es diferente, incrementando los niveles citoplásmicos de  $\text{Ca}^{2+}$  tras la unión de BDNF (Rose et al., 2003) y modulando la morfología glial a través de las proteínas Rho-GDI1. Estas proteínas son reguladores negativos de las Rho-GTPasas, por lo que su activación dependiente de BDNF en astrocitos, impide la formación de las fibras de estrés de actina. También se ha postulado que el incremento de TrkB-T1 en los astrocitos reactivos que rodean una lesión cerebral, participa en el reclutamiento y la recaptación del BDNF liberado al medio. De este modo se podría evitar el establecimiento de sinapsis entre las neuronas de la zona sana y la zona dañada, e impedir la afectación de neuronas que se encuentran alejadas de la lesión (Beck et al., 1993); (Belluardo et al., 1995); (Biffo et al., 1995).

#### 5.4 Regulación de TrkB en excitotoxicidad.

La activación de los receptores NMDA que contienen subunidades del tipo NR2B y la inducción del proceso de muerte neuronal excitotóxica, están estrechamente relacionadas con el cambio de expresión de las isoformas de TrkB que observamos en nuestro modelo de excitotoxicidad *in vitro*. Esta regulación se produce específicamente

en neuronas en tiempos relativamente tempranos. Sin embargo, no se produce una modificación de los niveles de TrkB-T1 en los astrocitos presentes en los cultivos. Como consecuencia de esta modificación, podrían verse comprometidas las señales de supervivencia dependientes de la vía BDNF/TrkB-FI. Se ha relacionado la sobreestimulación de los receptores NMDA, con la muerte neuronal producida en isquemia y otras patologías del SNC (Choi et al., 1988). También se ha vinculado con la pérdida de expresión de genes importantes para la supervivencia neuronal tales como *bdnf* o el propio *trkB*, como consecuencia de la inactivación de CREB (Lee et al., 2005); (Hardingham et al., 2002). A este respecto, los trabajos de Hardingham y colaboradores (Hardingham et al., 2002), ponen de manifiesto la naturaleza dual de la señalización dependiente de los receptores de NMDA. A bajas concentraciones, este agonista produce la activación de los receptores sinápticos constituidos por subunidades NR2A. Ésto induce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma celular y la fosforilación del factor de transcripción CREB. Por el contrario, concentraciones excitotóxicas de NMDA promueven, además, la activación de los receptores localizados en las regiones extrasinápticas, formados por subunidades NR2B. En estas condiciones, la activación de CREB por parte de los receptores de NMDA

sinápticos queda bloqueada por la activación de los extrasinápticos, lo que supone la pérdida de la transcripción de genes dependientes de este factor. Por tanto, aunque los receptores NMDA son fundamentales en la activación de rutas de supervivencia, también juegan un papel importante en la muerte neuronal por excitotoxicidad. Otro efector crítico en esta forma de muerte es la proteasa calpaína, cuya activación ocurre por concentraciones elevadas de  $\text{Ca}^{2+}$  como las que se producen en neuroexcitotoxicidad (Siman and Noszek, 1988). La activación de este enzima por daño neuronal isquémico, promueve la degradación de diversas proteínas del citoesqueleto (Yokota et al., 2003), de las subunidades NR2A y NR2B de los receptores NMDA (Wu et al., 2005) y de diversos factores de transcripción tales como CREB (Watt and Molloy, 1993), c-fos y c-jun (Hirai et al., 1991). También son sustratos de calpaína la proteína kinasa CaMKIV (Tremper-Wells et al., 2002) y la proteína CRMP-3 (*Collapsin response mediator protein-3*), implicada en la formación del cono de crecimiento axonal (Hou et al., 2006). La pérdida de la funcionalidad de CREB, ya sea por defosforilación inducida por la activación de los receptores de NMDA extrasinápticos (Hardingham et al., 2002), por corte proteolítico dependiente de calpaína (Watt and Molloy, 1993) o por ambos factores,

debería afectar en cierta medida a la transcripción basal del gen *trkB* dependiente de los elementos *trkB*-CREs y el promotor P2 (Deogracias et al., 2004). De esta manera, la pérdida de expresión de *TrkB*-F1 podría ser consecuencia de la falta de transcripción dependiente de CREB. Sin embargo, la inactivación de este factor no explica el aumento de los niveles de transcritos para *TrkB*-T1, por lo que debe existir un mecanismo capaz de controlar este cambio en el procesamiento alternativo del gen *trkB*. Será necesario, por tanto, la búsqueda de los mecanismos que controlan el procesamiento alternativo de este gen en condiciones de excitotoxicidad neuronal.

#### 5.5 Implicaciones de la regulación de *TrkB* en isquemia cerebral y otras patologías con componente excitotóxico.

#### 5.5 Implicaciones de la regulación de *TrkB* en isquemia cerebral y otras patologías con un componente excitotóxico.

La muerte celular excitotóxica es una característica común en la patogénesis de numerosos desórdenes neurológicos, entre ellos, la isquemia cerebral. Nosotros demostramos que en un modelo de isquemia cerebral en la rata adulta, se produce un

incremento de los niveles de TrkB-T1 en las neuronas corticales del territorio correspondiente a la ACM ocluida (Fig. 44), después de 60min de isquemia y 6h de reperusión. Sin embargo, a tiempos de reperusión más largos (24h), la expresión de TrkB-T1 se reduce drásticamente en el núcleo del infarto y sólo las neuronas que permanecen en el borde del infarto después de la isquemia-reperusión expresan TrkB-T1. Podemos pensar que, de forma análoga a lo que ocurre en el modelo celular donde observamos que el aumento de TrkB-T1 promueve la muerte neuronal, el aumento de los niveles de la isoforma truncada T1 podría interferir en la viabilidad neuronal, debido a su papel como inhibidor de la señalización de TrkB-Fl en neuronas (Haapasalo et al., 2001). Sería interesante comprobar si en este modelo *in vivo* se produce también la reducción de los niveles de TrkB-Fl y la pérdida de las rutas de señalización dependientes de él. Varios grupos observaron en la corteza frontal y en el hipocampo de individuos con enfermedad de Alzheimer, un aumento de los niveles de TrkB-T en neuronas y en la glia reactiva, y una disminución de los niveles de BDNF y TrkB-Fl (Allen et al., 1999); (Ferrer et al., 1999). Belluardo y colaboradores (Belluardo et al., 1995) observaron que la inyección en el hipocampo de ácido iboténico, una molécula excitotóxica, producía degeneración

neuronal, astrogliosis, la reducción de la expresión del ARNm de TrkB-Fl en neuronas y un incremento del ARNm de TrkB-T1 en astrocitos. Este incremento observado de la isoforma truncada de TrkB se producía a partir del tercer día después de la inyección del ácido, alcanzándose los niveles máximos de expresión después de 9 días y persistiendo después de 30. El aumento de la expresión de TrkB-T1 coincide, temporalmente, con el aumento de la proteína GFAP que Acarin y colaboradores (Acarin et al., 1999), observaron en astrocitos, después de la inyección de concentraciones altas de NMDA en la corteza cerebral de ratones adultos. Nosotros demostramos el incremento de la proteína TrkB-T1 en neuronas después del insulto isquémico, sin embargo, y a diferencia de los trabajos anteriores, no observamos el incremento de expresión en los astrocitos reactivos a los tiempos de reperusión estudiados. Estas diferencias pueden ser por el tipo de estímulo excitotóxico, el tiempo de duración del estímulo o la vulnerabilidad del tejido afectado. En este aspecto, sería interesante realizar un curso temporal y analizar los cambios de expresión de la proteína TrkB-T1 a tiempos de reperusión mayores. Se ha observado en neuronas de la médula espinal de enfermos con esclerosis lateral amiotrófica (Mutoh et al., 2000), la disminución en la fosforilación de TrkB-Fl y el aumento en los

niveles totales de ARNm y proteína de TrkB. La reducción de los niveles de P-TrkB podría ser una consecuencia de la disminución de la forma TrkB-FI, mientras que el aumento total de proteína y ARNm sería debido a un aumento de TrkB-T1, de forma análoga a lo que observamos en nuestro modelo *in vivo* de excitotoxicidad neuronal. Otros autores observaron en un modelo *in vivo* de la enfermedad de Huntington en ratones adultos, la disminución de los niveles de ARNm y proteína de TrkB-FI en neuronas de la corteza cerebral y el estriado (Gines et al., 2006). Sin embargo no encontraron cambios en los niveles de TrkB-T1. Ninguno de estos trabajos describe un posible mecanismo molecular que pudiera relacionar los cambios en los niveles de expresión de los receptores TrkB con el fenómeno de la muerte neuronal. Los trabajos desarrollados por Saarelainen y colaboradores (Saarelainen et al., 2000) con ratones transgénicos que presentan incrementados los niveles de TrkB-T1 en neuronas corticales e hipocampales, mostraron cierta correlación entre la muerte neuronal y la expresión de la isoforma truncada de TrkB. Observaron en este modelo que después de 45 minutos de oclusión de la ACM y de 24h de perfusión, el tamaño de la lesión era más grande en la corteza cerebral que en el estriado, donde TrkB-T1 no se sobre-expresaba. El mismo grupo demostró poco después que TrkB-T1

actuaba como un dominante negativo de TrkB-FI (Haapasalo et al., 2001). De esta manera se relacionaba, por primera vez *in vivo*, el incremento de TrkB-T1 con la pérdida de la activación de las cascadas de señalización dependientes de BDNF y NT-4/5 en neuronas. Igualmente, el grupo del Dr. Krueger (Dorsey et al., 2002) observó que en un modelo *in vivo* de síndrome de Down en ratones adultos, los cuales presentan trisomía del cromosoma 16 (Ts16), existía una mayor muerte neuronal como consecuencia de la pérdida de la señalización dependiente de BDNF. Estos autores observaron que la triplicación del cromosoma 16 producía el aumento de los niveles de TrkB-T1 en todas las neuronas analizadas. Además, relacionaron la expresión de TrkB-T1 con la muerte neuronal por pérdida de la funcionalidad de TrkB-FI. También demostraron que se recuperaba la supervivencia neuronal al sobre-expresar TrkB-FI, por infección de los cultivos neuronales procedentes de estos ratones. Sin embargo se reducía la supervivencia de cultivos procedentes de ratones salvajes, cuando éstos se transdujeron con un adenovirus TrkB-T1. Recientemente, el grupo del Dr. Tessarollo (Dorsey et al., 2006) demostró que la recuperación de los niveles fisiológicos de TrkB-T1 en los ratones Ts16, aumentaba la supervivencia de las neuronas corticales e hipocampales en cultivo, además

de restaurar la señalización dependiente de BDNF y los niveles basales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Nuestros resultados están de acuerdo con estas observaciones. De este modo, la infección de los cultivos primarios con TrkB-T1 reduce la supervivencia neuronal (Fig. 42), probablemente como consecuencia de la interrupción de las señales de supervivencia debidas a BDNF y TrkB-FI. Por el contrario, la sobre-expresión de TrkB-FI en nuestros cultivos retrasa la pérdida de viabilidad neuronal después del tratamiento con NMDA (Fig. 41). Estos datos sugieren que, durante cierto tiempo, la señalización dependiente de TrkB-FI es capaz de retrasar la degeneración neuronal debida a excitotoxicidad. Sin embargo, los efectos generados por el NMDA después de varias horas de tratamiento dominan sobre las señales dependientes de TrkB-FI, posiblemente por pérdida de funcionalidad del receptor de neurotrofinas como el descrito por Rusanescu y colaboradores ([Rusanescu et al., 2005](#)). Éstos demostraron que en cultivos de neuronas cerebelares, el incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico producido por estímulos excitotóxicos, promueve la activación de la fosfatasa SHP2. Esta proteína está encargada de defosforilar al receptor TrkB-FI y suprimir su señalización. De esta manera, estos autores describieron un nuevo mecanismo por el cuál se produce en neuronas la pérdida

de las vías de supervivencia dependientes de TrkB-FI, como consecuencia de estímulos que promueven la muerte neuronal por excitotoxicidad. Todos estos datos, en conjunto, no sólo relacionan la descompensación de los niveles de los receptores TrkB-FI y TrkB-T1, y la pérdida de las señales dependientes de la isoforma completa de este receptor con la muerte neuronal, sino que sugieren firmemente que éste es uno de los procesos que intervienen en la excitotoxicidad neuronal. Por tanto, la regulación de las distintas isoformas de TrkB, podría ser un mecanismo molecular común en diferentes patologías con un componente excitotóxico, además de en la isquemia cerebral focal.

## **6. Conclusiones**



De los resultados que presentamos en esta memoria se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El aumento de los niveles citoplásmicos de AMPc promueve la transcripción del gen *trkB* en astrocitos y neuronas corticales. Esta activación depende de la fosforilación del factor de transcripción CREB por la proteína quinasa A (PKA).
2. El aumento de los niveles de ARNm y proteína de TrkB-T1 en cultivos primarios de astrocitos corticales tratados con ATP induce la fosforilación de CREB a través de las proteínas kinasas CaMKs.
3. La forma activada del factor CREB se une a los elementos *trkB*-CREs localizados en la zona 5' del gen *trkB*, activando la transcripción a través de la región promotora P2.
4. Existe un uso diferencial de los elementos *trkB*-CREs por parte de P-CREB en función de que sea PKA o CaMK la responsable de su fosforilación.
5. La activación excitotóxica de los receptores de glutamato tipo NMDA origina un cambio en el patrón de expresión de las isoformas de TrkB específicamente en neuronas, disminuyendo la expresión de TrkB-FI y aumentando la de TrkB-T1.
6. La muerte neuronal por excitotoxicidad y los cambios en la expresión de las isoformas del receptor de neurotrofinas TrkB están correlacionados.
7. La sobre-expresión neuroespecífica del receptor TrkB-FI retrasa la muerte neuronal producida en excitotoxicidad, mientras que la sobre-expresión de TrkB-T1 la acelera.
8. Episodios isquémicos *in vivo* provocan un aumento de los niveles de TrkB-T1 en la corteza cerebral, de manera similar a como ocurre en el modelo *in vitro*.

## **7. Bibliografía**

- Acarin, L., Gonzalez, B., and Castellano, B. (1998). Stat3 and NFkappaB glial expression after excitotoxic damage to the postnatal brain. *Neuroreport* 9, 2869-2873.
- Acarin, L., Gonzalez, B., Hidalgo, J., Castro, A. J., and Castellano, B. (1999). Primary cortical glial reaction versus secondary thalamic glial response in the excitotoxically injured young brain: astroglial response and metallothionein expression. *Neuroscience* 92, 827-839.
- Ahn, S., Olivier, M., Aggarwal, S., Krylov, D., Ginty, D. D., and Vinson, C. (1998). A dominant-negative inhibitor of CREB reveals that it is a general mediator of stimulus-dependent transcription of c-fos. *Mol Cell Biol* 18, 967-977.
- Alcantara, S., Frisen, J., del Rio, J. A., Soriano, E., Barbacid, M., and Silos-Santiago, I. (1997). TrkB signaling is required for postnatal survival of CNS neurons and protects hippocampal and motor neurons from axotomy-induced cell death. *J Neurosci* 17, 3623-3633.
- Allen, S. J., Wilcock, G. K., and Dawbarn, D. (1999). Profound and selective loss of catalytic TrkB immunoreactivity in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 648-651.
- Andres-Barquin, P. J. (2002). Santiago Ramon y Cajal and the Spanish school of neurology. *Lancet Neurol* 1, 445-452.
- Arai, S., Kinouchi, H., Akabane, A., Owada, Y., Kamii, H., Kawase, M., and Yoshimoto, T. (1996). Induction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and the receptor trk B mRNA following middle cerebral artery occlusion in rat. *Neurosci Lett* 211, 57-60.
- Armanini, M. P., McMahon, S. B., Sutherland, J., Shelton, D. L., and Phillips, H. S. (1995). Truncated and catalytic isoforms of trkB are co-expressed in neurons of rat and mouse CNS. *Eur J Neurosci* 7, 1403-1409.
- Bamji, S. X., Majdan, M., Pozniak, C. D., Belliveau, D. J., Aloyz, R., Kohn, J., Causing, C. G., and Miller, F. D. (1998). The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J Cell Biol* 140, 911-923.
- Barbacid, M. (1994). The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 25, 1386-1403.
- Barbacid, M. (1995). Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors. *Ann Ny Acad Sci* 766, 442-458.
- Barde, Y.-A., Edgar, D., and Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *Embo J* 1, 549-553.
- Barettino, D., Pombo, P. M. G., Espliguero, G., and Rodriguez-Peña, A. (1999). The mouse neurotrophin receptor trkB gene is transcribed from two different promoters. *Biochem Biophys Acta* 1146, 24-34.
- Barker, P. A., and Shooter, E. M. (1994). Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron* 13, 203-215.
- Baxter, G. T., Radeke, M. J., Kuo, R. C., Makrides, V., Hinkle, B., Hoang, R., Medina-Selby, A., Coit, D., Valenzuela, P., and Feinstein, S. C. (1997). Signal transduction mediated by the truncated trkB receptor isoforms, trkB. T1 and trkB. T2. *J Neurosci* 17, 2683-2690.
- Beck, K. D., Lamballe, F., Klein, R., Barbacid, M., Schauwecker, P. E., McNeill, T. H., Finch, C. E., Hefti, F., and Day, J. R. (1993).

- Induction of noncatalytic TrkB neurotrophin receptors during axonal sprouting in the adult hippocampus. *J Neurosci* 13, 4001-4014.
- Belliveau, D. J., Krivko, I., Kohn, J., Lachance, C., Pozniak, C., Rusakov, D., Kaplan, D., and Miller, F. D. (1997). NGF and neurotrophin-3 both activate TrkA on sympathetic neurons but differentially regulate survival and neuritogenesis. *J Cell Biol* 136, 375-388.
- Belluardo, N., Salin, T., Dell'Albani, P., Mudo, G., Corsaro, M., Jiang, X. H., Timmusk, T., and Condorelli, D. F. (1995). Neurotoxic injury in rat hippocampus differentially affects multiple trkB and trkC transcripts. *Neurosci Lett* 196, 1-4.
- Benedetti, M., Levi, A., and Chao, M. V. (1993). Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7859-7863.
- Berkeimeier, L. R., Winslow, J. W., Kaplan, D. R., Nikolics, K., Goeddel, D. V., and Rosenthal, A. (1991). Neurotrophin-5: A novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* 7, 857-866.
- Bhattacharyya, A., Watson, F. L., Bradlee, T. A., Pomeroy, S. L., Stiles, C. D., and Segal, R. A. (1997). Trk receptors function as rapid retrograde signal carriers in the adult nervous system. *J Neurosci* 17, 7007-7016.
- Bibel, M., Hoppe, E., and Barde, Y. A. (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *Embo J* 18, 616-622.
- Biffo, S., Offenhauser, N., Carter, B. D., and Barde, Y. A. (1995). Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development* 121, 2461-2470.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A. E., Datta, S. R., Takasu, M. A., and Greenberg, M. E. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286, 1358-1362.
- Brewer, G. J., and Cotman, C. W. (1989). Survival and growth of hippocampal neurons in defined medium at low density: advantages of a sandwich culture technique or low oxygen. *Brain Res* 494, 65-74.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., and Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
- Canossa, M., Griesbeck, O., Berninger, B., Campana, G., Kolbeck, R., and Thoenen, H. (1997). Neurotrophin release by neurotrophins: implications for activity-dependent neuronal plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13279-13286.
- Carroll, P., Lewin, G. R., Koltzenburg, M., Toyka, K. V., and Thoenen, H. (1998). A role for BDNF in mechanosensation. *Nat Neurosci* 1, 42-46.
- Carter, B. D., Zirrgiebel, U., and Barde, Y. A. (1995). Differential regulation of p21ras activation in neurons by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* 270, 21751-21757.
- Casademunt, E., Carter, B. D., Benzel, I., Frade, J. M., Dechant, G., and Barde, Y. A. (1999). The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *Embo J* 18, 6050-6061.
- Centemeri, C., Bolego, C., Abbracchio, M. P., Cattabeni, F., Puglisi, L., Burnstock, G., and

- Nicosia, S. (1997). Characterization of the  $\text{Ca}^{2+}$  responses evoked by ATP and other nucleotides in mammalian brain astrocytes. *Br J Pharmacol* 121, 1700-1706.
- Clary, D. O., and Reichardt, L. F. (1994). An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci Usa* 91, 11133-11137.
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R., and Hamburger, V. (1954). A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A* 40, 1014-1018.
- Condorelli, D. F., Dell' Albani, P., Mudò, G., Timmusk, T., and Belluardo, N. (1994). Expression of neurotrophins and their receptors in primary astroglial cultures: induction by cyclic AMP-elevating agents. *J Neurochem* 63, 509-516.
- Conover, J. C., Erickson, J. T., Katz, D. M., Bianchi, L. M., Poueymirou, W. T., McClain, J., Pan, L., Helgren, M., Ip, N. Y., Boland, P., and et al. (1995). Neuronal deficits, not involving motor neurons, in mice lacking BDNF and/or NT4. *Nature* 375, 235-238.
- Cornell-Bell, A. H., and Finkbeiner, S. M. (1991).  $\text{Ca}^{2+}$  waves in astrocytes. *Cell Calcium* 12, 185-204.
- Crowder, R. J., and Freeman, R. S. (1998). Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J Neurosci* 18, 2933-2943.
- Crowley, C., Spencer, S. D., Nishimura, M. C., Chen, K. S., Pitts-Meek, S., Armanini, M. P., Ling, L. H., McMahon, S. B., Shelton, D. L., Levinson, A. D., and Phillips, H. S. (1994). Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* 76, 1001-1012.
- Chao, M. V. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4, 299-309.
- Chao, M. V., Bothwell, M. A., Ross, A. H., Koprowski, H., Lanahan, A. A., Buck, C. R., and Sehgal, A. (1986). Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science* 232, 518-521.
- Chen, K. S., Nishimura, M. C., Armanini, M. P., Crowley, C., Spencer, S. D., and Phillips, H. S. (1997). Disruption of a single allele of the nerve growth factor gene results in atrophy of basal forebrain cholinergic neurons and memory deficits. *J Neurosci* 17, 7288-7296.
- Chen, S. T., Hsu, C. Y., Hogan, E. L., Maricq, H., and Balentine, J. D. (1986). A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 17, 738-743.
- Choi, D. W., Koh, J. Y., and Peters, S. (1988). Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci* 8, 185-196.
- Chrivia, J. C., Kwok, R. P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M. R., and Goodman, R. H. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365, 855-859.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- Davey, F., and Davies, A. M. (1998). TrkB signalling inhibits p75-mediated apoptosis induced by nerve growth factor in embryonic

- proprioceptive neurons. *Curr Biol* 8, 915-918.
- Day, R. N., Walder, J. A., and Maurer, R. A. (1989). A protein kinase inhibitor gene reduces both basal and multihormone-stimulated prolactin gene transcription. *J Biol Chem* 264, 431-436.
- Dluzen, D. E., Gao, X., Story, G. M., Anderson, L. I., Kucera, J., and Walro, J. M. (2001). Evaluation of nigrostriatal dopaminergic function in adult  $+/+$  and  $+/-$  BDNF mutant mice. *Exp Neurol* 170, 121-128.
- Dobrowsky, R. T., Werner, M. H., Castellino, A. M., Chao, M. V., and Hannun, Y. A. (1994). Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* 265, 1596-1599.
- Dolci, C., Montaruli, A., Roveda, E., Barajon, I., Vizzotto, L., Grassi Zucconi, G., and Carandente, F. (2003). Circadian variations in expression of the *trkB* receptor in adult rat hippocampus. *Brain Res* 994, 67-72.
- Donovan, M. J., Hahn, R., Tessarollo, L., and Hempstead, B. L. (1996). Identification of an essential nonneuronal function of neurotrophin 3 in mammalian cardiac development. *Nat Genet* 14, 210-213.
- Dorsey, S. G., Bambrick, L. L., Balice-Gordon, R. J., and Krueger, B. K. (2002). Failure of brain-derived neurotrophic factor-dependent neuron survival in mouse trisomy 16. *J Neurosci* 22, 2571-2578.
- Dorsey, S. G., Renn, C. L., Carim-Todd, L., Barrick, C. A., Bambrick, L., Krueger, B. K., Ward, C. W., and Tessarollo, L. (2006). In vivo restoration of physiological levels of truncated *TrkB.T1* receptor rescues neuronal cell death in a trisomic mouse model. *Neuron* 51, 21-28.
- Dragunow, M., Beilharz, E., Sirimanne, E., Lawlor, P., Williams, C., Bravo, R., and Gluckman, P. (1994). Immediate-early gene protein expression in neurons undergoing delayed death, but not necrosis, following hypoxic-ischaemic injury to the young rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 25, 19-33.
- Drake, C. T., Milner, T. A., and Patterson, S. L. (1999). Ultrastructural localization of full-length *trkB* immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *J Neurosci* 19, 8009-8026.
- Du, J., Feng, L., Zaitsev, E., Je, H. S., Liu, X. W., and Lu, B. (2003). Regulation of *TrkB* receptor tyrosine kinase and its internalization by neuronal activity and  $Ca^{2+}$  influx. *J Cell Biol* 163, 385-395.
- Dugich-Djordjevic, M. M., Ohsawa, F., and Hefti, F. (1993). Transient elevation in catalytic *trkB* mRNA during postnatal development of the rat brain. *Neuroreport* 4, 1091-1094.
- Eide, F. F., Vining, E. R., Eide, B. L., Zang, K., Wang, X. Y., and Reichardt, L. F. (1996). Naturally occurring truncated *trkB* receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 16, 3123-3129.
- Elmer, E., Kokaia, M., Ernfors, P., Ferencz, I., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (1997). Suppressed kindling epileptogenesis and perturbed BDNF and *TrkB* gene regulation in NT-3 mutant mice. *Exp Neurol* 145, 93-103.
- Ernfors, P., Bengzon, J., Kokaia, Z., Persson, H., and Lindvall, O. (1991). Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during Kindling epileptogenesis. *Neuron* 7, 165-176.

- Ernfors, P., Ibañez, C. F., Ebenthal, T., Olson, L., and Persson, H. (1990). Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to  $\beta$ -NGF: developmental and topographical expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 5454-5458.
- Ernfors, P., Lee, K. F., and Jaenisch, R. (1994a). Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* 368, 147-150.
- Ernfors, P., Lee, K. F., Kucera, J., and Jaenisch, R. (1994b). Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell* 77, 503-512.
- Fan, G., Egles, C., Sun, Y., Minichiello, L., Renger, J. J., Klein, R., Liu, G., and Jaenisch, R. (2000). Knocking the NT4 gene into the BDNF locus rescues BDNF deficient mice and reveals distinct NT4 and BDNF activities. *Nat Neurosci* 3, 350-357.
- Fededa, J. P., de la Mata, M., Muñoz, M., Petrillo, E., Schor, I., Nogues, G., and Kornblihtt, A. R. (2004). Control of alternative splicing by RNA Pol II elongation. Paper presented at: Coupling between transcription and RNA processing (Baeza, Spain, Universidad Internacional de Andalucía. Sede Antonio Machado.).
- Ferrer, I., Marin, C., Rey, M. J., Ribalta, T., Goutan, E., Blanco, R., Tolosa, E., and Martí, E. (1999). BDNF and full-length and truncated TrkB expression in Alzheimer disease. Implications in therapeutic strategies. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 729-739.
- Frade, J. M., and Barde, Y. A. (1999). Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Development* 126, 683-690.
- Frank, L., Ventimiglia, R., Anderson, K., Lindsay, R. M., and Rudge, J. S. (1996). BDNF down-regulates neurotrophin responsiveness, TrkB protein and TrkB mRNA levels in cultured rat hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 8, 1220-1230.
- Franke, T. F., Kaplan, D. R., and Cantley, L. C. (1997a). PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88, 435-437.
- Franke, T. F., Kaplan, D. R., Cantley, L. C., and Toker, A. (1997b). Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275, 665-668.
- Frisen, J., Verge, V. M., Fried, K., Risling, M., Persson, H., Trotter, J., Hokfelt, T., and Lindholm, D. (1993). Characterization of glial trkB receptor: differential response to injury in the central and peripheral nervous systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 4971-4975.
- Fryer, R. H., Kaplan, D. R., Feinstein, S. C., Radeke, M. J., Grayson, D. R., and Kromer, L. F. (1996). Developmental and mature expression of full-length and truncated TrkB receptors in the rat forebrain. *J Comp Neurol* 374, 21-40.
- Fryer, R. H., Kaplan, D. R., and Kromer, L. F. (1997). Truncated trkB receptors on nonneuronal cells inhibit BDNF-induced neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol* 148, 616-627.
- Fumagalli, M., Brambilla, R., D'ambrosi, N., Volonte, C., Matteoli, M., Verderio, C., and Abbracchio, M. P. (2003). Nucleotide-Mediated Calcium Signaling in Rat Cortical Astrocytes: Role of P2X and P2Y Receptors. *Glia* 43, 218-230.



- Gascón, S. (2007) Mecanismos de regulación del receptor de glutamato tipo NMDA en excitotoxicidad e isquemia cerebral, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Ghosh, A., Carnahan, J., and Greenberg, M. E. (1994). Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 263, 1618-1623.
- Gines, S., Bosch, M., Marco, S., Gavalda, N., Diaz-Hernandez, M., Lucas, J. J., Canals, J. M., and Alberch, J. (2006). Reduced expression of the TrkB receptor in Huntington's disease mouse models and in human brain. *Eur J Neurosci* 23, 649-658.
- Goldman, J. E., and Abramson, B. (1990). Cyclic AMP-induced shape changes of astrocytes are accompanied by rapid depolymerization of actin. *Brain Res* 528, 189-196.
- Goldman, P. S., Tran, V. K., and Goodman, R. H. (1997). The multifunctional role of the co-activator CBP in transcriptional regulation. *Recent Prog Horm Res* 52, 103-119; discussion 119-120.
- Gomez-Pinilla, F., Ying, Z., Roy, R. R., Molteni, R., and Edgerton, V. R. (2002). Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *J Neurophysiol* 88, 2187-2195.
- Götz, R., Köster, R., Winkler, C., Raulf, F., Lottspeich, F., Scharf, M., and Thoenen, H. (1994). Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* 372, 266-269.
- Greenamyre, J. T., Maragos, W. F., Albin, R. L., Penney, J. B., and Young, A. B. (1988). Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 12, 421-430.
- Haapasalo, A., Koponen, E., Hoppe, E., Wong, G., and Castren, E. (2001). Truncated trkB.T1 is dominant negative inhibitor of trkB.TK+-mediated cell survival. *Biochem Biophys Res Commun* 280, 1352-1358.
- Haapasalo, A., Sipola, I., Larsson, K., Akerman, K. E., Stoilov, P., Stamm, S., Wong, G., and Castren, E. (2002). Regulation of TRKB surface expression by brain-derived neurotrophic factor and truncated TRKB isoforms. *J Biol Chem* 277, 43160-43167.
- Hadari, Y. R., Kouhara, H., Lax, I., and Schlessinger, J. (1998). Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation. *Mol Cell Biol* 18, 3966-3973.
- Hallbook, F., Ibanez, C. F., and Persson, H. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 6, 845-858.
- Hallböök, F., Ibanez, C. F., and Persson, H. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 6, 845-858.
- Hamanoue, M., Middleton, G., Wyatt, S., Jaffray, E., Hay, R. T., and Davies, A. M. (1999). p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol Cell Neurosci* 14, 28-40.
- Hamburger, V. (1939). *Physiol Zool* 12, 268-264.
- Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., and Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5, 405-414.

- Harper, G. P., and Thoenen, H. (1981). Target cells, biological effects, and mechanism of action of nerve growth factor and its antibodies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 21, 205-229.
- Hartley, D. M., and Choi, D. W. (1989). Delayed rescue of NMDAR-mediated neuronal injury in cortical cultures. *J Pharmacol Exp Ther* 250, 752-758.
- Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D. R., Parada, L. F., and Chao, M. V. (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogen and the low affinity NGF receptor. *Nature (Lond)* 350, 678-682.
- Hirai, S., Kawasaki, H., Yaniv, M., and Suzuki, K. (1991). Degradation of transcription factors, c-Jun and c-Fos, by calpain. *FEBS Lett* 287, 57-61.
- Hohn, A., Leibrok, J., Bailey, K., and Barde, Y.-A. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344, 339-341.
- Holgado-Madruga, M., Moscatello, D. K., Emlet, D. R., Dieterich, R., and Wong, A. J. (1997). Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12419-12424.
- Horton, A., Laramée, G., Wyatt, S., Shih, A., Winslow, J., and Davies, A. M. (1997). NGF binding to p75 enhances the sensitivity of sensory and sympathetic neurons to NGF at different stages of development. *Mol Cell Neurosci* 10, 162-172.
- Hou, S. T., Jiang, S. X., Desbois, A., Huang, D., Kelly, J., Tessier, L., Karchewski, L., and Kappler, J. (2006). Calpain-cleaved collapsin response mediator protein-3 induces neuronal death after glutamate toxicity and cerebral ischemia. *J Neurosci* 26, 2241-2249.
- Howard, P., Day, K. H., Kim, K. E., Richardson, J., Thomas, J., Abraham, I., Fleischmann, R. D., Gottesman, M. M., and Maurer, R. A. (1991). Decrease catalytic subunit mRNA levels and altered catalytic subunit mRNA structure in a cAMP-resistant Chinese Hamster Ovary cell line. *J Biol Chem* 266, 10189-10195.
- Huang, E. J., and Reichardt, L. F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72, 609-642.
- Hyman, C., Hofer, M., Barde, Y. A., Juhasz, M., Yancopoulos, G. D., Squinto, S. P., and Lindsay, R. M. (1991). BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* 350, 230-232.
- Hyman, C., Juhasz, M., Jackson, C., Wright, P., Ip, N. Y., and Lindsay, R. M. (1994). Overlapping and distinct actions of the neurotrophins BDNF, NT-3, and NT-4/5 on cultured dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalon. *J Neurosci* 14, 335-347.
- Ibanez, C. F., Ilag, L. L., Murray-Rust, J., and Persson, H. (1993). An extended surface of binding to Trk tyrosine kinase receptors in NGF and BDNF allows the engineering of a multifunctional pan-neurotrophin. *Embo J* 12, 2281-2293.
- Insel, P. A., and Ostrom, R. S. (2003). Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and G protein signaling. *Cell Mol Neurobiol* 23, 305-314.
- Ip, N. Y., Ibañez, C. F., Nye, S. H., McClain, J., Jones, P. F., Gies, D. R., Belluscio, L., Le Beau, M. M., Espinosa, R. I., Squinto, S. P.,

- et al.* (1992). Mamalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3060-3064.
- James, G., and Butt, A. M. (2002). P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca<sup>2+</sup> signalling in glial cell pathology in the central nervous system. *Eur J Pharmacol* 447, 247-260.
- Jing, S. Q., Tapley, P., and Barbacid, M. (1992). Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron* 9, 1067-1079.
- Johannessen, M., Delghandi, M. P., Seternes, O. M., Johansen, B., and Moens, U. (2004). Synergistic activation of CREB-mediated transcription by forskolin and phorbol ester requires PKC and depends on the glutamine-rich Q2 transactivation domain. *Cell Signal* 16, 1187-1199.
- Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C. R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M., and Chao, M. (1986a). Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47, 545-554.
- Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C. R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M., and Chao, M. (1986b). Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47, 545-554.
- Johnson, H., Hökfelt, T., and Ulfhake, B. (1996). Decreased expression of TrkB and TrkC mRNAs in spinal motoneurons of aged rats. *Eur J Neurosci* 8, 494-499.
- Kafitz, K. W., Rose, C. R., and Konnerth, A. (2000). Neurotrophin-evoked rapid excitation of central neurons. *Prog Brain Res* 128, 243-249.
- Kafitz, K. W., Rose, C. R., Thoenen, H., and Konnerth, A. (1999). Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature* 401, 918-921.
- Kaplan, D. R., Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Chao, M. V., and Parada, L. F. (1991). The trk proto-oncogene product: A signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science (Wash)* 252, 554-558.
- Kim, H. J., Hwang, J. J., Behrens, M. M., Snider, B. J., Choi, D. W., and Koh, J. Y. (2003). TrkB mediates BDNF-induced potentiation of neuronal necrosis in cortical culture. *Neurobiol Dis* 14, 110-119.
- Kingsbury, T. J., Murray, P. D., Bambrick, L. L., and Krueger, B. K. (2003). Ca(2+)-dependent regulation of TrkB expression in neurons. *J Biol Chem* 278, 40744-40748.
- Klein, R. (1994). Role of neurotrophins in mouse neuronal development. *Faseb J* 8, 738-744.
- Klein, R., Conway, D., Parada, L. F., and Barbacid, M. (1990a). The trkB neurotrophin tyrosine kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell* 61, 647-656.
- Klein, R., Jing, Q. S., Nanduri, V., O'Rourke, E., and Barbacid, M. (1991a). The trk proto-oncogene encodes for nerve growth factor receptor. *Cell* 65, 189-197.
- Klein, R., Lamballe, F., Bryant, S., and Barbacid, M. (1992). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. *Neuron* 8, 947-956.
- Klein, R., Martín-Zanca, D., and Barbacid, M. (1990b). Expression of the tyrosine kinase receptor gene trkB is confined to the murine embryonic and adult nervous system. *Development* 109, 845-850.

- Klein, R., Nundari, V., Jing, S., Lambelle, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K., Reichardt, L., and Barbacid, M. (1991b). The trkB tyrosine kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66, 395-403.
- Klein, R., Parada, L. F., Coulier, F., and Barbacid, M. (1989). TrkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J* 8, 3701-3709.
- Klein, R., Smeyne, R. J., Wurs, W., Long, L. K., Auerbach, B. A., Joyner, A. L., and Barbacid, M. (1993). Targeted disruption of the trkB neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell* 75, 113-122.
- Kokaia, Z., Gido, G., Ringstedt, T., Bengzon, J., Kokaia, M., Siesjö, B. K., Persson, H., and Lindvall, O. (1993). Rapid increase of BDNF mRNA levels in cortical neurons following spreading depression: regulation by glutamatergic mechanisms independent of seizure activity. *Brain Res Mol Brain Res* 19, 277-286.
- Kolbeck, R., Jungbluth, S., and Barde, Y. A. (1994). Characterisation of neurotrophin dimers and monomers. *Eur J Biochem* 225, 995-1003.
- Koponen, E., Lakso, M., and Castren, E. (2004a). Overexpression of the full-length neurotrophin receptor trkB regulates the expression of plasticity-related genes in mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 130, 81-94.
- Koponen, E., Voikar, V., Riekk, R., Saarelainen, T., Rauramaa, T., Rauvala, H., Taira, T., and Castren, E. (2004b). Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor trkB exhibit increased activation of the trkB-PLCgamma pathway, reduced anxiety, and facilitated learning. *Mol Cell Neurosci* 26, 166-181.
- Kornhauser, J. M., Cowan, C. W., Shaywitz, A. J., Dolmetsch, R. E., Griffith, E. C., Hu, L. S., Haddad, C., Xia, Z., and Greenberg, M. E. (2002). CREB transcriptional activity in neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events. *Neuron* 34, 221-233.
- Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H., and Bonhoeffer, T. (1995). Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8856-8860.
- Kouhara, H., Hadari, Y. R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I., and Schlessinger, J. (1997). A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* 89, 693-702.
- Kuruvilla, R., Ye, H., and Ginty, D. D. (2000). Spatially and functionally distinct roles of the PI3-K effector pathway during NGF signaling in sympathetic neurons. *Neuron* 27, 499-512.
- Ladiwala, U., Lachance, C., Simoneau, S., Bhakar, A., Barker, P. A., and Antel, J. P. (1998). p75 neurotrophin receptor expression on adult human oligodendrocytes. *J Neurosci* 18, 1297-1304.
- Lahtinen, S., Pitkanen, A., Koponen, E., Saarelainen, T., and Castren, E. (2003). Exacerbated status epilepticus and acute cell loss, but no changes in epileptogenesis, in mice with increased brain-derived neurotrophic factor signaling. *Neuroscience* 122, 1081-1092.
- Lambelle, F., Klein, R., and Barbacid, M. (1991). trkC, a new member of the trk family

- of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66, 967-979.
- Lambelle, F., Tapley, P., and Barbacid, M. (1993). *trkC* encodes multiple neurotrophin-3 receptors with distinct biological properties and substrate specificities. *Embo J* 12, 3083-3094.
- Lee, B., Butcher, G. Q., Hoyt, K. R., Impey, S., and Obrietan, K. (2005). Activity-dependent neuroprotection and cAMP response element-binding protein (CREB): kinase coupling, stimulus intensity, and temporal regulation of CREB phosphorylation at serine 133. *J Neurosci* 25, 1137-1148.
- Lee, F. S., Kim, A. H., Khursigara, G., and Chao, M. V. (2001a). The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Curr Opin Neurobiol* 11, 281-286.
- Lee, K. F., Bachman, K., Landis, S., and Jaenisch, R. (1994a). Dependence on p75 for innervation of some sympathetic targets. *Science* 263, 1447-1449.
- Lee, K. F., Davies, A. M., and Jaenisch, R. (1994b). p75-deficient embryonic dorsal root sensory and neonatal sympathetic neurons display a decreased sensitivity to NGF. *Development* 120, 1027-1033.
- Lee, P., Zhuo, H., and Helke, C. J. (2001b). Axotomy alters neurotrophin and neurotrophin receptor mRNAs in the vagus nerve and nodose ganglion of the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 87, 31-41.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K., and Hempstead, B. L. (2001c). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945-1948.
- Leibrock, J., Lottspeich, A., Hofer, M., Hengerer, B., Masiakowski, P., Thoenen, H., and Barde, Y.-A. (1989). Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341, 149-152.
- Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237, 1154-1162.
- Li, Y., Holtzman, D. M., Kromer, L. F., Kaplan, D. R., Chua-Couzens, J., Clary, D. O., Knusel, B., and Mobley, W. C. (1995). Regulation of TrkA and ChAT expression in developing rat basal forebrain: evidence that both exogenous and endogenous NGF regulate differentiation of cholinergic neurons. *J Neurosci* 15, 2888-2905.
- Lindfors, N., Brodin, E., and Metsis, M. (1995). Spatiotemporal selective effects on brain-derived neurotrophic factor and *trkB* messenger RNA in rat hippocampus by electroconvulsive shock. *Neuroscience* 65, 661-670.
- Lindholm, D., Castrén, E., Berzaghi, M., Blöchl, A., and Thoenen, H. (1994). Activity-dependent and hormonal regulation of neurotrophin mRNA levels in the brain--Implications for neuronal plasticity. *J Neurobiol* 25, 1362-1372.
- Lindholm, D., Dechant, G., Heisenberg, C. P., and Thoenen, H. (1993). Brain-derived neurotrophic factor is a survival factor for cultured rat cerebellar granule neurons and protects them against glutamate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 5, 1455-1464.
- Lindvall, O., Kokaia, Z., Bengzon, J., Elmer, E., and Kokaia, M. (1994). Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci* 17, 490-496.
- Liu, T. H., Beckman, J. S., Freeman, B. A., Hogan, E. L., and Hsu, C. Y. (1989). Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am J Physiol* 256, H589-593.

- Liu, X., Ernfors, P., Wu, H., and Jaenisch, R. (1995). Sensory but not motor neuron deficits in mice lacking NT4 and BDNF. *Nature* 375, 238-241.
- Liu, Y., Meiri, K. F., Cynader, M. S., and Gu, Q. (1996). Nerve growth factor induced modification of presynaptic elements in adult visual cortex in vivo. *Brain Res* 732, 36-42.
- Loeb, D. M., Stephens, R. M., Copeland, T., Kaplan, D. R., and Greene, L. A. (1994). A Trk nerve growth factor (NGF) receptor point mutation affecting interaction with phospholipase C-gamma 1 abolishes NGF-promoted peripherin induction but not neurite outgrowth. *J Biol Chem* 269, 8901-8910.
- Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J., and Baltimore, D. (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295, 868-872.
- Lonze, B. E., and Ginty, D. D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35, 605-623.
- Luikart, B. W., Nef, S., Shipman, T., and Parada, L. F. (2003). In vivo role of truncated trkB receptors during sensory ganglion neurogenesis. *Neuroscience* 117, 847-858.
- Lyons, W. E., Mamounas, L. A., Ricaurte, G. A., Coppola, V., Reid, S. W., Bora, S. H., Wihler, C., Koliatsos, V. E., and Tessarollo, L. (1999). Brain-derived neurotrophic factor deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 15239-15244.
- Majdan, M., Lachance, C., Gloster, A., Aloyz, R., Zeindler, C., Bamji, S., Bhakar, A., Belliveau, D., Fawcett, J., Miller, F. D., and Barker, P. A. (1997). Transgenic mice expressing the intracellular domain of the p75 neurotrophin receptor undergo neuronal apoptosis. *J Neurosci* 17, 6988-6998.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory).
- Martín-Zanca, D., Barbacid, M., and Parada, L. F. (1990). Expression of the trk proto-oncogen is restricted to the sensory cranial and spinal ganglia of neural crest origin in mouse development. *Genes Dev* 4, 683-694.
- Martín-Zanca, D., Oskman, R., Mitra, G., Copeland, T., and Barbacid, M. (1989). Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogen. *Mol Cell Biol* 9, 24-33.
- Masana, Y., Wanaka, A., Kato, H., Asai, T., and Tohyama, M. (1993). Localization of trkB mRNA in postnatal brain development. *J Neurosci Res* 35, 468-479.
- Mason, J. M., Beattie, B. K., Liu, Q., Dumont, D. J., and Barber, D. L. (2000). The SH2 inositol 5-phosphatase Ship1 is recruited in an SH2-dependent manner to the erythropoietin receptor. *J Biol Chem* 275, 4398-4406.
- Maurer, R. A. (1989). Both isoforms of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit can activate transcription of the prolactin gene. *J Biol Chem* 264, 6870-6873.
- Merlio, J.-P., Ernfors, P., Kokaia, Z., Middlemas, D. S., Bengzon, J., Kokaia, M., Siesjö, B. K., Hunter, T., Lindvall, O., and Persson, H. (1993). Increased production of trkB protein-tyrosine kinase receptor after brain insults. *Neuron* 10, 151-164.
- Metsis, M., Timmusk, T., Arenas, E., and Persson, H. (1993). Differential usage of

- multiple brain-derived neurotrophic factor promoters in the rat brain following neuronal activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8802-8806.
- Meyer-Franke, A., Wilkinson, G. A., Kruttgen, A., Hu, M., Munro, E., Hanson Jr., M. G., Reichardt, L. F., and Barres, B. A. (1998). Depolarization and cAMP elevation rapidly recruits TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron* 21, 681-693.
- Middlemas, D. S., Lindberg, R. A., and Hunter, T. (1991). trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol Cell Biol* 11, 143-153.
- Mobley, W. C., Rutkowski, J. L., Tennekoon, G. I., Gemski, J., Buchanan, K., and Johnston, M. V. (1986). Nerve growth factor increases choline acetyltransferase activity in developing basal forebrain neurons. *Brain Res* 387, 53-62.
- Mukai, J., Hachiya, T., Shoji-Hoshino, S., Kimura, M. T., Nadano, D., Suvanto, P., Hanaoka, T., Li, Y., Irie, S., Greene, L. A., and Sato, T. A. (2000). NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR. *J Biol Chem* 275, 17566-17570.
- Muragaki, Y., Chou, T. T., Kaplan, D. R., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (1997). Nerve growth factor induces apoptosis in human medulloblastoma cell lines that express TrkA receptors. *J Neurosci* 17, 530-542.
- Mutoh, T., Sobue, G., Hamano, T., Kuriyama, M., Hirayama, M., Yamamoto, M., and Mitsuma, T. (2000). Decreased phosphorylation levels of TrkB neurotrophin receptor in the spinal cords from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem Res* 25, 239-245.
- Nichols, M., Weih, F., Schmid, W., DeVack, C., Kowenz-Leutz, E., Luckow, B., Boshart, M., and Schutz, G. (1992). Phosphorylation of CREB affects its binding to high and low affinity sites: implications for cAMP induced gene transcription. *Embo J* 11, 3337-3346.
- Nilsson, A. S., Fainzilber, M., Falck, P., and Ibanez, C. F. (1998). Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Lett* 424, 285-290.
- Ninkina, N., Adu, J., Fisher, A., Pinon, L., Buchman, V. L., and Davies, A. M. (1996). Expression and function of trkb variants in developing sensory neurons. *Embo J* 15, 6385-6393.
- Ninkina, N., Grashchuck, M., Buchman, V. L., and Davies, A. M. (1997). TrkB variants with deletions in the leucine-rich motifs of the extracellular domain. *J Biol Chem* 272, 13019-13025.
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K. K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M. S., Jacobsen, C., Kliemann, M., Schwarz, E., Willnow, T. E., et al. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427, 843-848.
- Obermeier, A., Lammers, R., Wiesmuller, K. H., Jung, G., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1993). Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex. *J Biol Chem* 268, 22963-22966.
- Ohira, K., Homma, K. J., Hirai, H., Nakamura, S., and Hayashi, M. (2006). TrkB-T1 regulates the RhoA signaling and actin cytoskeleton in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 342, 867-874.



- Ohira, K., Kumanogoh, H., Sahara, Y., Homma, K. J., Hirai, H., Nakamura, S., and Hayashi, M. (2005). A truncated tropomyosin-related kinase B receptor, TrkB, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor 1. *J Neurosci* 25, 1343-1353.
- Otto, C., Kovalchuk, Y., Wolfer, D. P., Gass, P., Martin, M., Zuschratter, W., Gröne, H. J., Kellendonk, C., Tronche, F., Maldonado, R., *et al.* (2001). Impairment of Mossy Fiber Long-Term Potentiation and Associative Learning in Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide Type I Receptor-Deficient Mice. *21*, 5520-5527.
- Pandolfi, P. P., Alcalay, M., Fagioli, M., Zangrilli, D., Mencarelli, A., Diverio, D., Biondi, A., Lo Coco, F., Rambaldi, A., Grignani, F., *et al.* (1992). Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR $\alpha$  transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR $\alpha$  isoforms in acute promyelocytic leukaemia. *The EMBO Journal* 11, 1397-1407.
- Pascual, O., Casper, K. B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J. Y., Takano, H., Moss, S. J., McCarthy, K., and Haydon, P. G. (2005). Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* 310, 113-116.
- Pastor, R., Bernal, J., and Rodríguez-Peña, A. (1994). Unliganded c-erbA/thyroid hormone receptor induces trkB expression in neuroblastoma cells. *Oncogene* 9, 1081-1089.
- Qian, X., Riccio, A., Zhang, Y., and Ginty, D. D. (1998). Identification and characterization of novel substrates of Trk receptors in developing neurons. *Neuron* 21, 1017-1029.
- Ralevic, V., Burrell, S., Kingdom, J., and Burnstock, G. (1997). Characterization of P2 receptors for purine and pyrimidine nucleotides in human placental cotyledons. *Br J Pharmacol* 121, 1121-1126.
- Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361, 1545-1564.
- Renau-Piqueras, J., Zaragoza, R., De Paz, P., Báguena-Cervellera, R., Megias, L., and Guerri, C. (1989). Effects of prolonged ethanol exposure on the glial fibrillary acidic protein-containing intermediate filaments of astrocytes in primary culture: a quantitative immunofluorescence and immunogold electron microscopic study. *J Histochem Cytochem* 37, 229-240.
- Renn, C. L., Lin, L., Thomas, S., and Dorsey, S. G. (2006). Full-length tropomyosin-related kinase B expression in the brainstem in response to persistent inflammatory pain. *Neuroreport* 17, 1175-1179.
- Riccio, A., Pierchala, B. A., Ciarallo, C. L., and Ginty, D. D. (1997). An NGF-TrkA-mediated retrograde signal to transcription factor CREB in sympathetic neurons. *Science* 277, 1097-1100.
- Rodríguez-Tébar, A., Dechant, G., and Barde, Y. A. (1990). Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 4, 487-492.
- Rodríguez-Tebar, A., Dechant, G., Gotz, R., and Barde, Y. A. (1992). Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *Embo J* 11, 917-922.
- Rose, C. R., Blum, R., Pichler, B., Lepier, A., Kafitz, K. W., and Konnerth, A. (2003). Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* 426, 74-78.

- Roux, P. P., and Barker, P. A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 67, 203-233.
- Rusanescu, G., Yang, W., Bai, A., Neel, B. G., and Feig, L. A. (2005). Tyrosine phosphatase SHP-2 is a mediator of activity-dependent neuronal excitotoxicity. *Embo J* 24, 305-314.
- Saarelainen, T., Hendolin, P., Lucas, G., Koponen, E., Sairanen, M., MacDonald, E., Agerman, K., Haapasalo, A., Nawa, H., Aloyz, R., *et al.* (2003). Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci* 23, 349-357.
- Saarelainen, T., Lukkarinen, J. A., Koponen, S., Grohn, O. H., Jolkkonen, J., Koponen, E., Haapasalo, A., Alhonen, L., Wong, G., Koistinaho, J., *et al.* (2000). Transgenic mice overexpressing truncated trkB neurotrophin receptors in neurons show increased susceptibility to cortical injury after focal cerebral ischemia. *Mol Cell Neurosci* 16, 87-96.
- Salehi, A., Ocampo, M., Verhaagen, J., and Swaab, D. F. (2000a). P75 neurotrophin receptor in the nucleus basalis of meynert in relation to age, sex, and Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 161, 245-258.
- Salehi, A. H., Roux, P. P., Kubu, C. J., Zeindler, C., Bhakar, A., Tannis, L. L., Verdi, J. M., and Barker, P. A. (2000b). NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron* 27, 279-288.
- Salin, T., Mudo, G., Jiang, X. H., Timmusk, T., Metsis, M., and Belluardo, N. (1995). Up-regulation of trkB mRNA expression in the rat striatum after seizures. *Neurosci Lett* 194, 181-184.
- Schuman, E. M. (1999). Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol* 9, 105-109.
- Segal, R. A., Takahashi, H., and McKay, R. D. (1992). Changes in neurotrophin responsiveness during the development of cerebellar granule neurons. *Neuron* 9, 1041-1052.
- Shapiro, D. L. (1973). Morphological and biochemical alterations in foetal rat brain cells cultured in the presence of monobutyl cyclic AMP. *Nature* 241, 203-204.
- Siman, R., and Noszek, J. C. (1988). Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. *Neuron* 1, 279-287.
- Smeyne, R. J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L. K., Bryant, S., Lewin, A., Lira, S. A., and Barbacid, M. (1994). Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* 368, 246-249.
- Snider, W. D. (1994). Functions of the neurotrophins during nervous system development. *Cell* 77, 627-638.
- Stephens, R. M., Loeb, D. M., Copeland, T. D., Pawson, T., Greene, L. A., and Kaplan, D. R. (1994). Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron* 12, 691-705.
- Stoilov, P., Castren, E., and Stamm, S. (2002). Analysis of the human trkB gene genomic organization reveals novel trkB isoforms, unusual gene length, and splicing

- mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290, 1054-1065.
- Strohmaier, C., Carter, B. D., Urfer, R., Barde, Y. A., and Dechant, G. (1996). A splice variant of the neurotrophin receptor trkB with increased specificity for brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J* 15, 3332-3337.
- Sun, P., Enslen, H., Myung, P. S., and Maurer, R. A. (1994). Differential activation of CREB by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev* 8, 2527-2539.
- Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D. B., Shaywitz, A. J., and Greenberg, M. E. (1998). Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20, 709-726.
- Teng, H. K., Teng, K. K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R. D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z. Y., Lee, F. S., *et al.* (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* 25, 5455-5463.
- Thoenen, H., and Stockel, K. (1975). Ortho- and retrograde axonal transport: importance for the function of adrenergic neurones. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 2, 1-5.
- Timmusk, T., Belluardo, N., Persson, H., and Metsis, M. (1994). Developmental regulation of brain-derived neurotrophic factor messenger RNAs transcribed from different promoters in the rat brain. *Neuroscience* 60, 287-291.
- Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintam, T., Paalme, V., Saarma, M., and Persson, H. (1993). Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* 10, 475-489.
- Tong, L., and Perez-Polo, R. (1998). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protects cultured rat cerebellar granule neurons against glucose deprivation-induced apoptosis. *J Neural Transm* 105, 905-914.
- Tongiorgi, E., Righi, M., and Cattaneo, A. (1997). Activity-dependent dendritic targeting of BDNF and TrkB mRNAs in hippocampal neurons. *J Neurosci* 17, 9492-9505.
- Tremper-Wells, B., Mathur, A., Beaman-Hall, C. M., and Vallano, M. L. (2002). Trophic agents that prevent neuronal apoptosis activate calpain and down-regulate CaMKIV. *J Neurochem* 81, 314-324.
- Tsoufas, P., Soopet, D., Escandon, E., Tessarollo, L., Mendoza, R. J., Rosenthal, A., Nikolics, A., and Parada, L. F. (1993). The rat trkC locus encodes multiple neurogenic receptors that exhibit differential response to neurotrophin-3 in PC12 cells. *Neuron* 10, 975-990.
- Tsui-Pierchala, B. A., and Ginty, D. D. (1999). Characterization of an NGF-P-TrkA retrograde-signaling complex and age-dependent regulation of TrkA phosphorylation in sympathetic neurons. *J Neurosci* 19, 8207-8218.
- Valenzuela, D. M., Maisonpierre, P. C., Glass, D. J., Rojas, E., Nunez, L., Kong, Y., Gies, D. R., Stitt, T. N., Ip, N. Y., and Yancopoulos, G. D. (1993). Alternative forms of rat TrkC with different functional capabilities. *Neuron* 10, 963-974.
- Verdi, J. M., Birren, S. J., Ibanez, C. F., Persson, H., Kaplan, D. R., Benedetti, M., Chao, M. V., and Anderson, D. J. (1994). p75LNGFR regulates Trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells. *Neuron* 12, 733-745.

- Vetter, M. L., Martin-Zanca, D., Parada, L. F., Bishop, J. M., and Kaplan, D. R. (1991). Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by a kinase activity associated with the product of the trk protooncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5650-5654.
- Viegas, L. R., Vicent, G. P., Baraño, J. L., and Beato, M. (2004). Steroid Hormones Induce bcl-X Gene Expression through Direct Activation of Distal Promoter P4. *J Biol Chem* 279, 9831-9839.
- Walton, K. M., Reh fuss, R. P., Chrivia, J. C., Lochner, J. E., and Goodman, R. H. (1992). A dominant repressor of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-regulated enhancer binding protein activity inhibits the cAMP-mediated induction of the somatostatin promoter in vivo. *Mol Endocrinol*, 647-655.
- Watson, F. L., Heerssen, H. M., Moheban, D. B., Lin, M. Z., Sauvageot, C. M., Bhattacharyya, A., Pomeroy, S. L., and Segal, R. A. (1999). Rapid nuclear responses to target-derived neurotrophins require retrograde transport of ligand-receptor complex. *J Neurosci* 19, 7889-7900.
- Watt, F., and Molloy, P. L. (1993). Specific cleavage of transcription factors by the thiol protease, m-calpain. *Nucleic Acids Research* 21, 5092 -5100.
- Wiegmann, K., Schutze, S., Machleidt, T., Witte, D., and Kronke, M. (1994). Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 78, 1005-1015.
- Wright, D. E., Zhou, L., Kucera, J., and Snider, W. D. (1997). Introduction of a neurotrophin-3 transgene into muscle selectively rescues proprioceptive neurons in mice lacking endogenous neurotrophin-3. *Neuron* 19, 503-517.
- Wu, H. Y., Yuen, E. Y., Lu, Y. F., Matsushita, M., Matsui, H., Yan, Z., and Tomizawa, K. (2005). Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by calpain in cortical neurons. *J Biol Chem* 280, 21588-21593.
- Xie, J., and Black, D. L. (2001). A CaMK IV responsive RNA element mediates depolarization-induced alternative splicing of ion channels. *Nature* 410, 936-939.
- Xie, J., Jan, C., Stoilov, P., Park, J., and Black, D. L. (2005). A consensus CaMKIV-responsive RNA sequence mediates regulation of alternative exons in neurons. *RNA* 11, 1825-1834.
- Yamada, M., Ohnishi, H., Sano, S., Nakatani, A., Ikeuchi, T., and Hatanaka, H. (1997). Insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 are tyrosine-phosphorylated and associated with phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *J Biol Chem* 272, 30334-30339.
- Yokota, M., Saido, T. C., Kamitani, H., Tabuchi, S., Satokata, I., and Watanabe, T. (2003). Calpain induces proteolysis of neuronal cytoskeleton in ischemic gerbil forebrain. *Brain Res* 984, 122-132.
- Yoon, S. O., Casaccia-Bon nefil, P., Carter, B., and Chao, M. V. (1998). Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci* 18, 3273-3281.
- Young, A. B., Greenamyre, J. T., Hollingsworth, Z., Albin, R., D'Amato, C., Shoulson, I., and Penney, J. B. (1988). NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease. *Science* 241, 981-983.
- Zafra, F., Hengerer, B., Leibrock, J., Thoenen, H., and Lindholm, D. (1990). Activity dependent regulation of BDNF and NGF

mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *Embo J* 9, 3545-3550.

Zhuang, H. X., Synder, C. K., Pu, S. F., and Ishii, D. N. (1996). Insulin-like growth factors reverse or arrest diabetic neuropathy. *Exp Neurol* 140, 198-205.

## **8. Publicaciones**

# Expression of the neurotrophin receptor *trkB* is regulated by the cAMP/CREB pathway in neurons

Rubén Deogracias, Gemma Espliguero, Teresa Iglesias, and Angeles Rodríguez-Peña\*

*Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM, 28029 Madrid, Spain*

Received 8 October 2003; revised 12 March 2004; accepted 16 March 2004  
Available online 6 May 2004

*trkB* as receptor for neurotrophins brain-derived neurotrophic factor (BDNF)/neurotrophin (NT)-4/5 plays a crucial role during development, maintenance of the adult brain, and its adaptation to injury or pathological conditions. In spite of this, very little is known about the mechanisms that regulate its expression. Here, we show that forskolin (Fk) rapidly stimulates the expression of both the full-length and truncated *trkB* isoforms in primary cultures of cortical neurons. Gel shift assays and transient transfection experiments demonstrate that this activation occurs via a protein kinase A (PKA)/cyclic AMP-responsive element-binding protein (CREB)-dependent mechanism. Activated CREB binds to the second cyclic AMP (cAMP)-responsive element (CRE) of the two CRE sites located within the P2 promoter of the *trkB* gene, which is able to confer cAMP responsiveness to a heterologous promoter. Our results illustrate that the *trkB* gene is a target for CREB regulation and explain the increase of *trkB* expression produced in different adaptative responses of the nervous system where CREB is participating.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

The neurotrophins are a family of secreted proteins that potently regulate diverse neuronal responses essential for the proper development and maintenance of the nervous system. Family members include nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), and neurotrophin 4/5 (NT-4/5). Classically, they are known to serve as target-derived trophic factors that adjust the type and number of afferent synapses by promoting the survival of discrete neuronal populations. However, it is now very well established that neurotrophins have many other functions. They regulate differentiation, influence cell fate

choices, and control neurite morphology (recently reviewed in Bibel and Barde, 2000). These neurotrophins act through the Trk family of tyrosine kinase receptors. NGF is ligand for TrkA, whereas BDNF and NT-4/5 bind to the products of the *trkB* gene and NT-3 binds to TrkC. Besides, these neurotrophins bind to a common receptor, known as p75, with low affinity (reviewed in Barbacid, 1994; Bothwell, 1995; Lindsay, 1994).

The *trkB* gene is a large and complex locus encoding four isoforms that are generated by differential splicing: a full-length receptor containing the tyrosine kinase domain (*trkB* full-length) (Klein et al., 1989, 1991), two truncated forms lacking catalytic activity (*trkB*-T1, *trkB*-T2) (Klein et al., 1990), and a novel isoform lacking the tyrosine kinase domain but containing an Shc binding site (*trkB*-T-Shc) (Stoilov et al., 2002). Both the full-length and the truncated isoforms of *trkB* are transcribed from two different promoters (Baretino et al., 1999).

Besides the traditional role in neuronal development and survival, BDNF/*trkB* is also required for the maintenance and function of the adult nervous system as demonstrated recently, studying heterozygote and conditional knockout animals. Young BDNF<sup>+/−</sup> adults show learning deficits and develop an enhanced aggressiveness and hyperphagia, accompanied by weight gain (Kernie et al., 2000; Lyons et al., 1999). Conversely, mice made *trkB*-deficient in adulthood show a substantial reduction of the long-term potentiation (LTP) in the hippocampus. Moreover, these animals become increasingly impaired over time with regard to their spatial learning behavior (Minichiello et al., 1999; Xu et al., 2000).

In the adult brain, *trkB* expression is able to respond to external stimuli. Thus, a rapid and transient increase on *trkB* mRNA levels is produced by cerebral hypoxic/ischemic injury (Merlio et al., 1993; Narumiya et al., 1998), by repeated stress (Nibuya et al., 1999) and by the late phase of LTP in the hippocampus (Dragunow et al., 1997). Kainate-induced seizures and antidepressant drug treatments also stimulated *trkB* expression in brain cortex, striatum, and hippocampus (Merlio et al., 1993; Nibuya et al., 1995; Salin et al., 1995). Despite this wealth of information, the factors that control *trkB* expression during development or in the adult brain remain mostly unknown. We have previously described that thyroid hormone represses *trkB* expression in the developing brain through a negative response element (Pombo et al., 2000). In addition, we have characterized the *trkB* promoters (Baretino et al., 1999) and analyzed putative regulatory sequences on this gene. In search for the possible regulators of the *trkB* gene, we found that forskolin

**Abbreviations:** CAT, chloramphenicol acetyltransferase; bp, base pair(s); Kb, kilobase pair(s); nt, nucleotide(s); EMSA, electrophoretic mobility shift assay; CREB, cyclic AMP-responsive element binding protein; CRE, cyclic AMP-responsive element; PBS, phosphate buffered saline; RSV, Rous sarcoma virus; PCR, polymerase chain reaction; PKA, protein kinase A; TK, thymidine kinase.

\* Corresponding author. Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM, Arturo Duperier, 4, 28029 Madrid, Spain. Fax: +34-915-854-401.

E-mail address: arodriguez@iib.uam.es (A. Rodríguez-Peña).



(Fk) rapidly stimulates the expression of both the full-length and truncated *trkB* isoforms in primary cultures of cortical neurons. We also demonstrate that this activation occurs via a protein kinase A (PKA)/cyclic AMP-responsive element-binding protein (CREB)-dependent mechanism through a novel cyclic AMP (cAMP)-responsive element (CRE) site present in the *trkB* gene.

## Results

### *Forskolin stimulates trkB expression in cortical neurons*

In search of possible regulators of the *trkB* gene, we studied if *trkB* mRNA expression was affected by changes in cAMP intracellular levels. RNase protection assays were performed using total RNA isolated from rat cultured cortical neurons that were stimulated with 30  $\mu$ M Fk for varying periods of time, because Fk is known to produce an increase in intracellular cAMP levels (Insel and Ostrom, 2003). The riboprobe used was designed to generate two protected fragments of different size, one corresponding to the *trkB* full-length and the other to the truncated isoforms. In addition, a riboprobe for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA was included in the assay as a control. As shown in Fig. 1A, a clear increase in both *trkB* full-length and *trkB* truncated mRNAs was detected within 1 h of Fk induction and continued increasing for at least 4 h. Quantitation of the bands corresponding to each *trkB* mRNA isoform, after correction with the expression level of GAPDH as loading control, from three independent experiments is shown in Fig. 1B. Fk-stimulated *trkB* expression with a rapid time course attaining an approximately 2.5- to 3-fold increase in both full-length and truncated transcripts after 4 h. This result was confirmed by Western blot analysis. *trkB* protein expression was studied in cortical neurons after 5- and 16-h Fk treatment (Fig. 1C). Following the same pattern as their mRNAs, exposure to Fk increases approximately 3.4-fold the full-length *trkB* isoform and approximately 2.4-fold the truncated receptors. Fk also increased the amount of phospho-*trkB* observed in response to BDNF stimulation (Fig. 1D), demonstrating that there is an increase of functional full-length *trkB* after Fk treatment. This rapid activation of *trkB* expression suggested a direct stimulation of the *trkB* gene transcription mediated by the presence of a cAMP response element (CRE) in the regulatory sequences of this gene. Indeed, a computerized search of the *trkB* gene 5'-flanking region that we have previously characterized (Barettino et al., 1999) revealed two putative CREs (*trkB*-CREs) located between positions -920 and -900 of the *trkB* gene, spaced by four nucleotides (gctCTGCGTCAGcccTCACGTCActt).

### *CREB interacts with the pair of two putative cAMP response elements present in the trkB gene*

To resolve if nuclear proteins from cortical neurons could bind the *trkB*-CREs, we performed electrophoretic mobility shift assay (EMSA) assays with extracts from Fk-treated neurons during 2, 4, and 6 h and the *trkB*-CREs probe (Fig. 2A). For comparison, we did the same experiment with nuclear proteins from neuro (N)2a-*cerbA* cells, a neuroblastoma cell line that has been made to express its endogenous *trkB* gene (Pastor et al., 1994). Fk stimulation increased the binding activity present in cortical neurons, showing a good correlation between this increase and the stimulation of *trkB* expression observed in Fig. 1. The same effect was

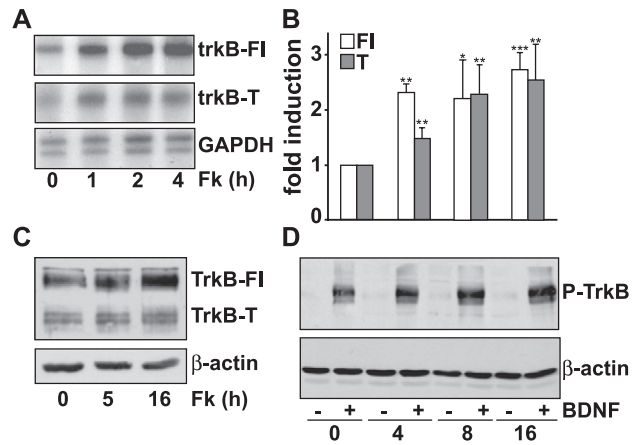


Fig. 1. Forskolin stimulates both full-length and truncated *trkB* expression in primary cortical neurons. (A) Fk increased *trkB* mRNAs expression. Total RNA was isolated from cortical neurons cultures treated with 30  $\mu$ M of Fk for 1, 2, and 4 h or solvent for 4 h (0), and 20  $\mu$ g was then subjected to an RNase protection assay. The *trkB* riboprobe used produced two protected bands, one of 390 bp corresponding to the full-length receptor isoform and the other of 238 bp to the truncated isoforms. As a loading control, the GAPDH riboprobe was included. Autoradiogram from a representative experiment is shown. (B) Quantification of the *trkB* full-length (FI) and truncated (T) mRNA levels. For each time point, *trkB* expression was referred to levels of GAPDH mRNA to correct for loading differences. The fold induction was calculated from the relative *trkB* mRNAs levels, and the mean  $\pm$  SD from three independent experiments is shown. ( $P$  \* < 0.05,  $P$  \*\* < 0.01,  $P$  \*\*\* < 0.005, significantly different compared to the control, Student *t* test). (C) Fk increased full-length (TrkB-FI) and truncated (TrkB-T) *trkB* protein. Cortical neurons were treated with 30  $\mu$ M of Fk for 5 and 16 h as indicated and harvested for Western blot analysis using antibodies to the extracellular domain of TrkB or to actin. (D) BDNF-stimulated phospho-*trkB* (P-TrkB) was enhanced by treatment with Fk. Cortical neurons were treated with Fk for 4, 8, and 16 h and then exposed to BDNF (20 ng/ml) for 10 min. Western blotting was carried out using an anti-phospho-*trkB* antibody, which recognizes Tyr-phosphorylation in ligand-activated TrkB. As loading control, the membrane was incubated with an anti-actin antibody.

also detected in nuclear extracts from Fk-stimulated N2a-*cerbA* cells (Fig. 2A). Interestingly, these cells presented two major retarded bands that increased after Fk addition. Next, we characterized this binding activity by competing and comparing with a canonical CRE (cCRE). Fig. 2B shows that competition with 50- and 100-fold molar excess of unlabeled *trkB*-CREs (W) could specifically inhibit the complex produced by the *trkB*-CREs as well as the addition of 50- and 100-molar excess of unlabeled cCRE (C). Cortical neuronal extracts presented one major specific retarded band; meanwhile, the N2a-*cerbA* cells showed two, migrating one of them (marked by the arrow) at the same position as the major band found in cortical neurons. These protein/DNA complexes were not affected by the addition of the nonspecific oligonucleotide (NS). In both type of cell extracts, the presence of nonspecific retarded bands was observed. EMSA using the cCRE as probe and cortical neurons or N2a-*cerbA* nuclear extracts produced similar specific protein/DNA complexes (Fig. 2C). When analyzed simultaneously, the retarded complex(es) produced by the *trkB*-CREs and the cCRE migrated at the same position in both cortical neurons and N2a-*cerbA* cells (result not shown).

To resolve if CREB is a component of the protein complex that binds to the *trkB*-CREs oligonucleotide, a specific anti-CREB antibody was added to the protein/DNA binding reaction, and the

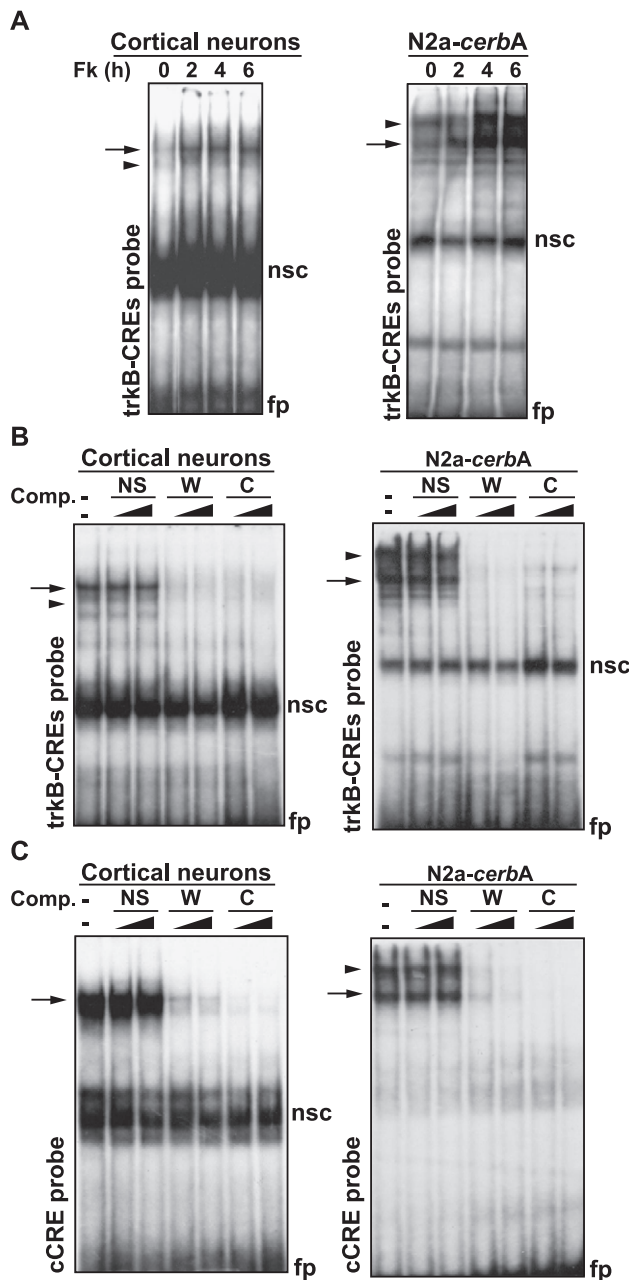


Fig. 2. Cortical neurons and neuroblastoma N2a-cerba cells contain protein(s) that bind to the trkB-CREs and consensus CRE sequences. (A) EMSA using a  $^{32}$ P-labeled 25-bp probe containing the trkB-CREs motif and Fk-stimulated nuclear extracts from cortical neurons or N2a-cerba cells. Cells were solvent-stimulated (0) or stimulated with 30  $\mu$ M of Fk for 2, 4, 6, and 8 h. (B) Nuclear protein extracts from cortical neurons and N2a-cerba cultures stimulated with 30  $\mu$ M of Fk for 4 h were used in EMSA with the trkB-CREs probe. Competitors: NS indicates nonspecific oligonucleotide; W, trkB-CREs, and C, consensus CRE. They were used at 50- or 100-fold excess over the probe, represented by the black triangles. (C) EMSA using  $^{32}$ P-labeled 26-bp probe containing the consensus CRE motif (cCRE) and Fk-stimulated nuclear extracts from cortical neurons or N2a-cerba cells. The specific retarded bands are marked by arrows and arrowheads. The arrow denotes the position of the DNA/protein complexes formed by trkB-CREs and the consensus CRE in cortical neurons or N2a-cerba cells with the same electrophoretic mobility. Nonspecific retarded bands (nsc) present in the nuclear extracts and free probe (fp) are marked.

effect on complex formation was assessed. To increase the resolution of the retarded bands, the gels were run for longer time as described in Experimental methods. We found that in the presence of the anti-CREB antibody, the major specific protein/DNA complex (arrow) was supershifted (asterisk) in cortical neurons (Fig. 3A). No supershift was observed for the second minor specific

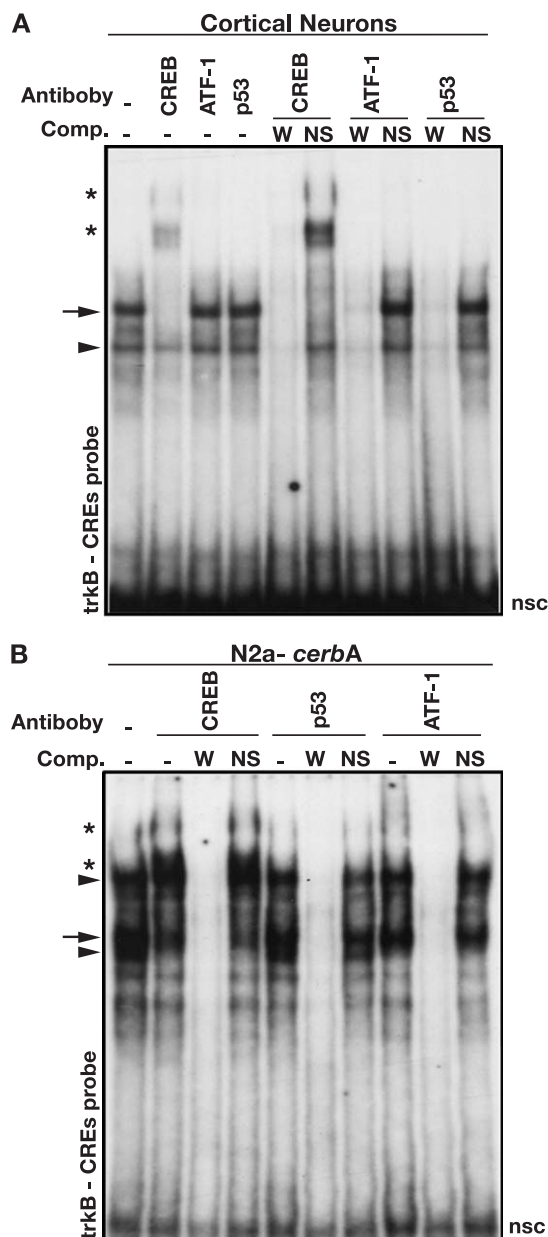


Fig. 3. CREB is part of the complex that binds to trkB-CREs. Antibodies to CREB and/or to ATF-1 can supershift the protein complex from cortical neurons (A) or N2a-cerba cultures (B) stimulated with 30  $\mu$ M of Fk for 4 h. As control antibody, anti-p53 was used. Competitors, trkB-CREs (W) or nonspecific (NS) oligonucleotides were added to the reaction at 100-fold molar excess relative to the  $^{32}$ P-labeled probe. To increase the resolution of the retarded bands, the gels were run for longer time as described in Experimental methods, allowing the free probe to be released from the gel. The radioactivity present at the bottom of the gel corresponds to the nonspecific complex (nsc) shown in Fig. 2. Arrows show the specific trkB-CREs retarded bands, and asterisks indicate the supershifted bands.

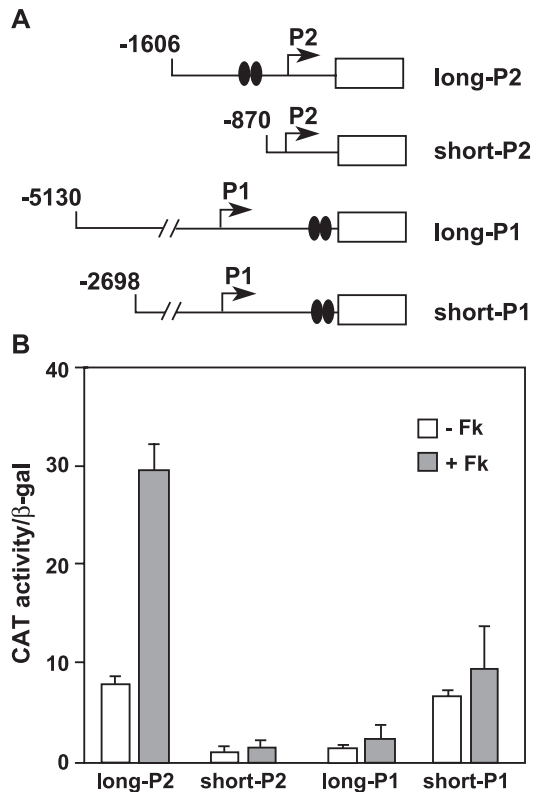


Fig. 4. The trkB-CREs are required for transactivation of the TrkB promoter 2 in response to Fk stimulation. The transcriptional activity of different 5'-deletion constructs of the trkB promoter cloned upstream the CAT gene was tested in transient transfection experiments in N2a-cerbA cells stimulated with solvent (open bars) or with Fk for 6 h (solid bars). Duplicate 35-mm plates received 3  $\mu$ g of plasmid DNA, including 2  $\mu$ g of the indicated CAT reporter and 1  $\mu$ g of the CMV-LacZ internal control plasmid. Values are CAT activity normalized with its corresponding luciferase activity. Results are the mean  $\pm$  SD of three different experiments.

band (arrow head). Addition of anti-ATF-1 (other CREB family member) or anti-p53 antibodies did not modify the migration of the retarded bands, indicating that the effect of the anti-CREB antibody is specific and reflects the presence of CREB in the major complex. On the other hand, the specific retarded bands found in N2a-cerbA cell extracts shown in Fig. 2 were resolved in several bands by means of these higher resolution gels (Fig. 3B). Addition of anti-CREB antibody supershifted two of the most prominent retarded bands (marked by arrows) to the positions marked by the asterisks. Since the position of the lower supershifted band is very close to the position of the higher molecular weight complex, we observed a prominent increase of the retarded complex at this position upon antibody addition (Fig. 3B). Anti-ATF-1 antibodies supershifted the lower band, suggesting the presence of both CREB family members in part of the complexes.

#### *The trkB-CREs and CREB are required for transactivation of trkB promoter P2 in response to Fk*

The trkB gene is transcribed from two promoters with transcription initiation sites localized at -1800 for promoter 1 (P1) and -448 for promoter 2 (P2) (Barettino et al., 1999). To test the ability of the trkB-CREs to regulate trkB promoter activity in response to

Fk, a series of deletion constructs were created. For the transient transfection experiments, we used N2a-cerbA cells because of its high efficiency of transfection and the facility of its culture. Sixteen hours after transfection of the various deletion constructs, the cultures were Fk-stimulated for 6 h and harvested for chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assays. The construct long-P2 that contained the two putative CRE and the P2 was dramatically activated after Fk treatment. In contrast, the short-P2 construct, where these CREs were deleted, was unaffected by the treatment (Fig. 4). Interestingly, these sequences do not confer transactivation by Fk to the trkB P1, since two constructs of different length (long-P1 and short-P1) showed no activation after Fk treatment, indicating that the second promoter mediates Fk regulation.

Although the gel shift experiments suggested that CREB is part of the complex that forms at the trkB promoter (Fig. 3), they do not show whether CREB is functionally required for promoter transactivation. We, therefore, examined the effect of expressing various

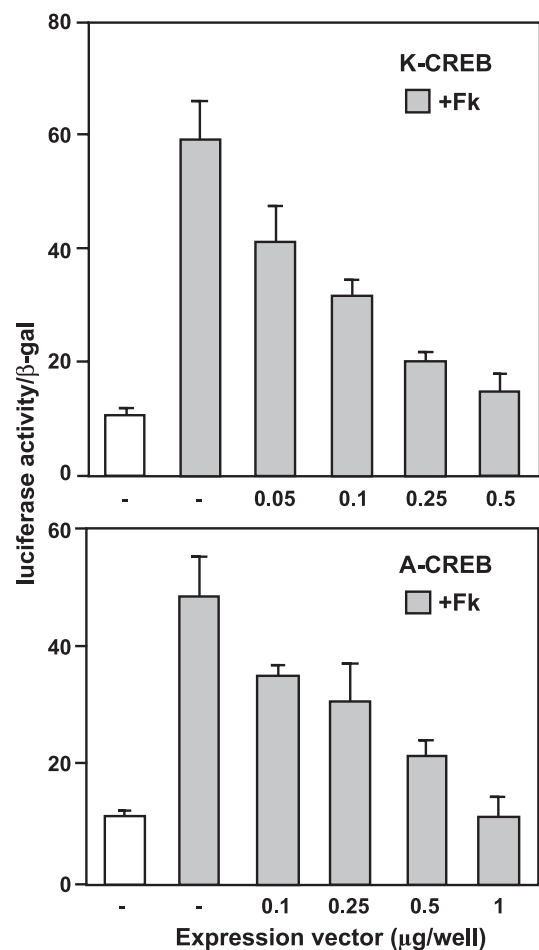


Fig. 5. CREB binds to the trkB-CREs and mediates trkB transcription. N2a-cerbA cells were transfected with the dominant negative CREB expression vectors at different concentrations, K-CREB (0 to 0.5  $\mu$ g) or A-CREB (0 to 1  $\mu$ g). In each case, 1  $\mu$ g of -1600trkB-P2-Luc reporter and 0.5  $\mu$ g of the internal control plasmid SV40-LacZ were also cotransfected. Sixteen hours after transfection, cells were stimulated with solvent (open bars) or with 30  $\mu$ M of Fk (solid bars) for 6 h. Cell extracts were then assayed for luciferase and  $\beta$ -galactosidase activity. Each value represents the mean of the relative luciferase activity  $\pm$  SD of three independent experiments.

dominant negative CREB mutants on transactivation of the -1600trkB-P2-luciferase (Luc) reporter in N2a-*cerbA* cells (Fig. 5). K-CREB, a CREB form with a mutation in the DNA binding domain (Walton et al., 1992), acts as a dominant repressor of the wild-type factor blocking the ability of wild-type CREB to bind to the CRE when present as a K-CREB:CREB heterodimer. This mutant acts as a dominant repressor in vivo, completely blocking the ability of wild-type CREB to mediate induction by protein kinase-A. When a K-CREB expression vector was cotransfected into N2a-*cerbA* cells along with the -1600trkB-P2-Luc construct, the presence of K-CREB effectively inhibited Fk stimulation of the trkB P2-driven luciferase expression in a dose-dependent manner (Fig. 5, upper panel). We also tested the effect of A-CREB, another dominant negative mutant of CREB that works by a different mechanism. A-CREB has an acidic amphipathic extension at the N terminus of CREB leucine zipper domain. As a consequence, A-

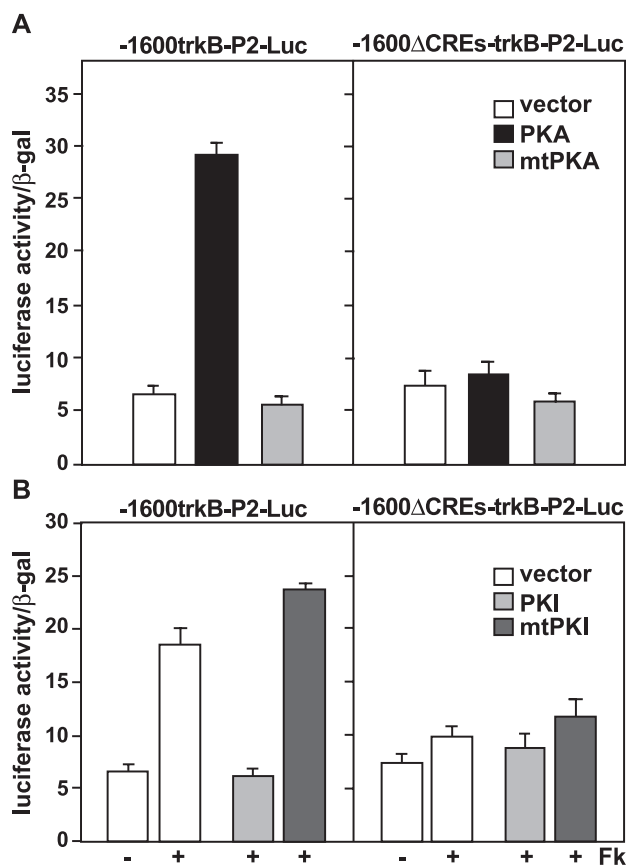


Fig. 6. Cyclic AMP activation of trkB promoter-2 is mediated by the PKA-dependent phosphorylation of CREB and requires the presence of the trkB-CREs. (A) N2a-*cerbA* cells were transfected with a constitutively active PKA or nonactive mutated PKA (mtPKA) expression vectors, together with the -1600trkB-P2-Luc reporter (left panel) or the -1600ΔCRE-trkB-P2-Luc reporter vector (right panel) in which the putative trkB-CREs are deleted. Results are the mean of the relative luciferase activity  $\pm$  SD from three different experiments. (B) N2a-*cerbA* cells were cotransfected with either PKA inhibitor expression vector (PKI) or a mutated form of it (mtPKI) together with the trkB P2 reporter plasmid (-1600trkB-P2-Luc). Cells were stimulated with solvent (-) or Fk (+) for 6 h before harvesting. In the right panel, N2a-*cerbA* cells were transfected and stimulated as before, but the trkB P2 reporter plasmid was the deleted mutant -1600ΔCRE-trkB-P2-Luc. Results are the mean of the relative luciferase activity  $\pm$  SD from three different experiments.

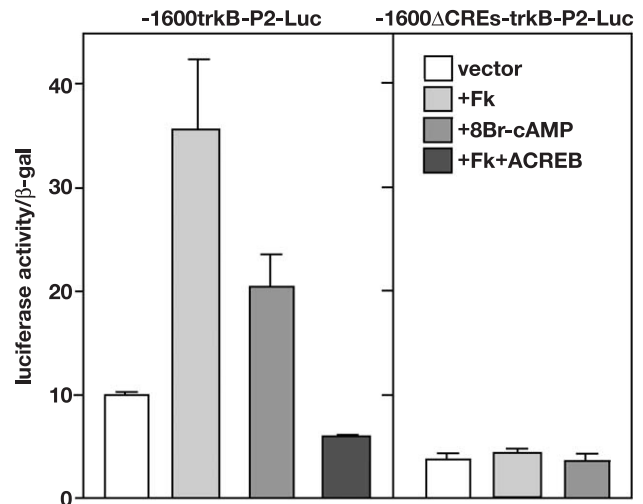


Fig. 7. Activation of trkB promoter 2 by FK in cortical neurons is mediated by CREB and the trkB-CREs. Cortical neurons were transfected with the -1600trkB-P2-Luc reporter (left panel) or the -1600ΔCRE-trkB-P2-Luc reporter vector (right panel). Cells were stimulated with 30  $\mu$ M of Fk for 6 h or 2 mM 8Br-cAMP for 24 h. Parallel cultures were cotransfected with 0.5  $\mu$ g of the dominant negative mutant A-CREB and then Fk-stimulated for 6 h before harvesting (+Fk+ACREB). Cell extracts were assayed for luciferase and  $\beta$ -galactosidase activity. Each value represents the mean of the relative luciferase activity  $\pm$  SD of three independent experiments.

CREB dimerizes with CREB family members with high affinity and prevents them from binding to CREs (Ahn et al., 1998). We found that A-CREB is able to effectively inhibit Fk induction of the -1600trkB-P2-Luc construct in a dose-dependent manner (Fig. 5, lower panel). These findings support the conclusion that CREB plays a critical role in mediating the response of the trkB promoter to increased cAMP levels produced by Fk treatment.

To directly evaluate the role of PKA and CREB phosphorylation in the control of trkB expression, we next looked at the effects on trkB transcriptional activation of transfecting the catalytic subunit of PKA or an inactive mutant (Howard et al., 1991). As shown in Fig. 6A, PKA expression in N2a-*cerbA* markedly increased the activity of the reporter -1600trkB-P2-Luc, meanwhile the inactive mutant (mtPKA) did not modify its basal expression. Furthermore, inhibition of CREB phosphorylation by expressing the PKA inhibitor (PKI) (Day et al., 1989) abolished the FK-dependent transactivation of -1600trkB-P2-Luc (Fig. 6B) but not its inactive mutant (mtPKI). PKA/CREB activation of trkB pro-

Table 1

Comparison with a consensus CRE of the trkB-CREs and mutants used in the present study

Oligonucleotide	Sequence
cCRE (C)	tcgacttgccTGACGTCAgagagctc
trkB-CREs (W)	tcgaCTGCGTCAgcccTCACGTCAc
mt1-CREs (M1)	tcgaCCGTAGTAGcccTCACGTCAc
mt2-CREs (M2)	tcgaCTGCGTCAgcccTACTAGTAc
mt1,2-CREs (M3)	tcgaCCGTAGTAGcccTACTAGTAc

The sequence of the consensus element present in the somatostatin gene (C) is here compared to the CREs sequence of the trkB gene (W). Mutated (mt) oligonucleotide containing mutations in the first CRE (M1), in the second CRE (M2), or in both (M3) are shown. Oligonucleotides are in the 5' to 3' orientation. Italics indicate the mutated regions.



motor 2 is mediated by the *trkB*-CREs, since the deletion construct, -1600 $\Delta$ CREs-*trkB*-P2-Luc, was nonresponsive either to Fk or to the expression of PKA (Fig. 6). Thus, activation of *trkB* promoter 2 by Fk is mediated by the PKA-dependent phosphorylation of CREB and requires the presence of the *trkB*-CREs. Since the results presented, so far, have been obtained in the neuroblastoma cell line N2a-*cerbA*, we sought to confirm

that the same mechanism was regulating *trkB* expression in cortical neurons in response to Fk. To this aim, we transiently transfected cortical neurons with the -1600*trkB*-P2-Luc construct and the *trkB*-CREs deletion construct -1600 $\Delta$ CREs-*trkB*-P2-Luc and studied its activation in response to Fk (Fig. 7). Addition of Fk or 8Br-cAMP activates *trkB*-P2 promoter, and this activation was mediated by the *trkB*-CREs, since the deletion construct,

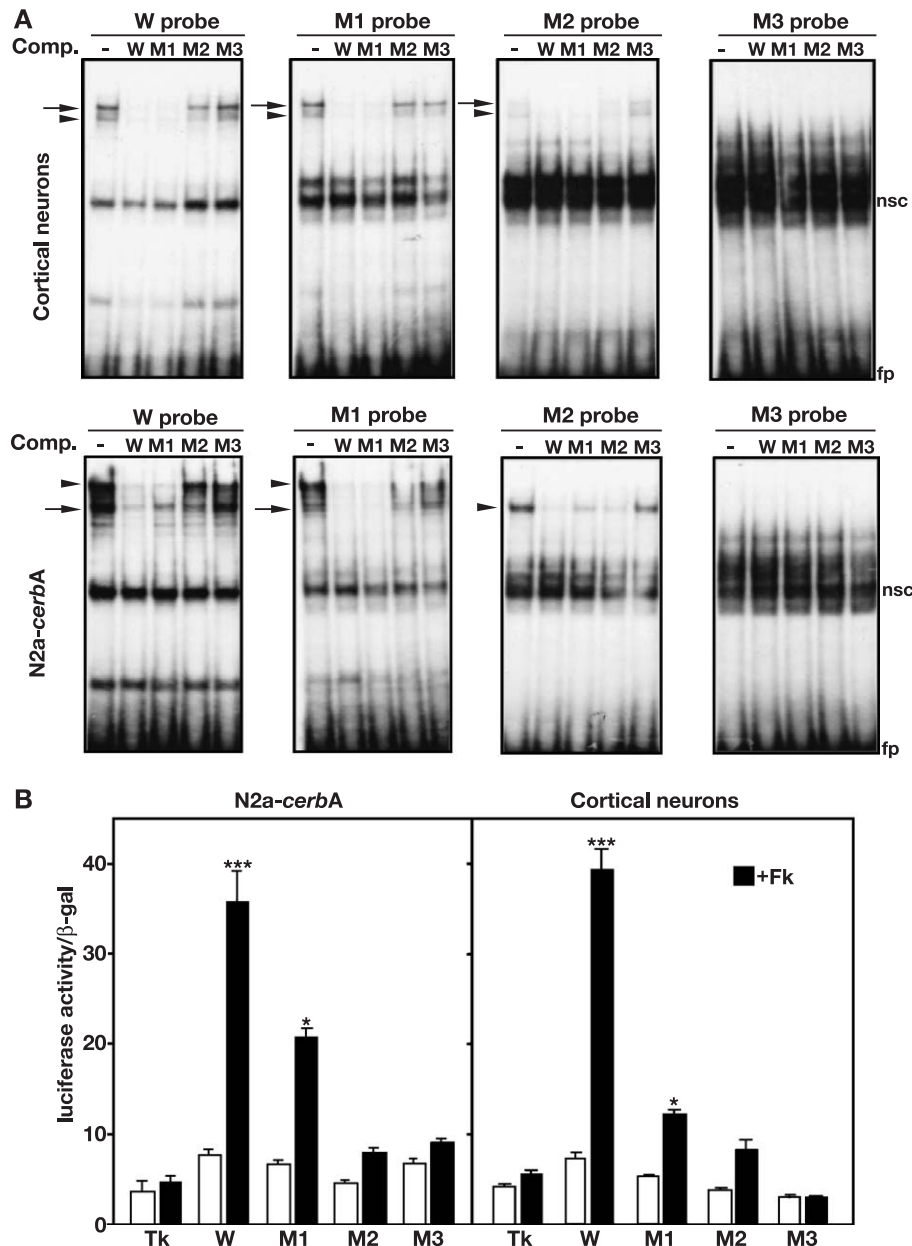


Fig. 8. The second *trkB*-CRE site is essential for the binding of CREB and the activation of a basal heterologous promoter by Fk. (A) EMSA showing complexes formed on the different probes containing the *trkB*-CREs motif (W) or three mutant forms (M1, M2, and M3) (Table 1). The nuclear cell extracts correspond to Fk-stimulated cortical neurons (upper panel) or N2a-*cerbA* (lower panel) cells. Competition was performed with a 100-fold molar excess of cold-specific *trkB*-CREs (W) or mutated (M1, M2, and M3) competitors. The specific retarded bands are marked by arrows and arrowheads. The arrow denotes the position of the DNA/protein complexes formed by *trkB*-CREs in cortical neurons or N2a-*cerbA* cells with the same electrophoretic mobility. Nonspecific retarded bands (nsc) present in the nuclear extracts and free probe (fp) are marked. (B) N2a-*cerbA* (left panel) and cortical neurons (right panel) were transfected with 1  $\mu$ g of each reporter plasmid in which *trkB*-CREs (W) or the three mutated forms (M1, M2, and M3) have been cloned upstream of the basal TK promoter. After transfection, the cells were stimulated with 30  $\mu$ M or Fk (solid bars) or solvent (open bars) for 6 h before harvesting. Values are mean of the relative luciferase activity  $\pm$  SEM from three different experiments. ( $P$  \* < 0.05,  $P$  \*\*\* < 0.001, significantly different compared to unstimulated cells, Student  $t$  test).

-1600 $\Delta$ CREs-trkB-P2-Luc, was not able to respond to Fk or to 8Br-cAMP. Furthermore, Fk activation of trkB-P2 promoter was inhibited when the A-CREB mutant was cotransfected, supporting the conclusion that CREB mediates Fk activation of the trkB. Thus, trkB promoter 2 regulation in cortical neurons by Fk was mediated by CREB and the presence of the trkB-CREs.

*The second trkB-CRE site is responsible for transactivation and CREB binding*

To evaluate the contribution of each CRE element present in trkB-P2, 25-mer oligonucleotides containing both trkB-CREs or mutations in each CRE (M1, M2) or both (M3) were synthesized (Table 1). Using these oligonucleotides as labeled probes, we studied in a mobility gel shift assay their ability to bind cortical neurons (Fig. 8A, upper panel) or N2a-cerbA (Fig. 8A, lower panel) nuclear proteins. We found that incubation of nuclear extracts, prepared from Fk-stimulated cells, with the oligonucleotide containing the trkB-CREs motif (W) and the M1 variant, resulted in the generation of the specific retarded band. On the other hand, the M2 probe, with the mutation of the second putative CRE, showed a very minor specific binding in cortical neurons as well as in N2a-cerbA and displayed very low affinity binding for CREB, since it was not able to compete the binding produced by the wild-type or M1 probes. As expected, the double mutant (M3) showed no binding site for CREB in both cortical neurons and N2a-cerbA cells. Finally, we studied if the ability of each CRE element to bind neuronal and N2a-cerbA nuclear proteins correlated with their transactivation activity (Fig. 8B). The different oligonucleotides (W, M1, M2, and M3) were cloned upstream of the basal thymidine kinase (TK) promoter in the pTK-Luc plasmid to evaluate their effect on the transactivation of a non-PKA-regulated basal promoter. The response to Fk was analyzed after transfecting N2a-cerbA cells (Fig. 8B, left panel) or cortical neurons (Fig. 8B, right panel) with these reporter constructs. As shown in Fig. 7B, Fk activated the TK promoter by the trkB-CREs in cortical neurons as efficiently as in N2a-cerbA cells. For comparison, one copy of the consensus CRE sequence was also cloned in the same reporter and transfected in both cell types. We found that the trkB-CREs sequence is capable of conferring a cAMP induction similar to that produced by other CREs (results not shown). The introduction of substitution mutations affecting the second CRE sequence (M2), which showed a very weak specific binding capacity in the EMSA experiments, resulted in reporter constructs whose activation by Fk was not significant in N2a-cerbA or neuronal cultures (Fig. 8B). However, the reporter with the mutation on the first, and less conserved, CRE (M1) was still activated by Fk, although to a lesser extent than the wild-type sequence (Fig. 8B). All together, these results demonstrate that the second CRE present in trkB promoter 2 is playing a major role on trkB transcriptional activation in response to the stimulation of the cAMP-PKA-CREB pathway in cortical neurons and N2a-cerbA cells.

## Discussion

In this study, we have demonstrated that cAMP/PKA stimulates trkB gene expression through the binding of CREB to a CRE site located 450 nucleotides 5' of the site of transcription initiation of the trkB P2. The expression of the neurotrophin

receptor trkB is rapidly increased in primary cultures of rat cortical neurons after Fk treatment. Cortical neurons, as previously reported for hippocampal neurons, express predominantly the full-length trkB receptor. In these cultures, elevation of cAMP by Fk addition results in a robust and rapid increase of the trkB expression for both full-length and truncated trkB receptors at the mRNA and protein level. The quality of the response suggested that this regulation could be transcriptional and that the putative pair of CREs previously identified during our characterization of the trkB gene could be active (Barettino et al., 1999). Transient transfection experiments with different deletion mutants of the trkB gene reveal that these CREs regulate the activity of the trkB promoter 2 but not the promoter 1 in response to Fk (Fig. 4). The specific regulation of this promoter does not have any implication on the isoforms expressed, since both full-length and truncated forms are transcribed from the two promoters. Interestingly, cAMP signaling has also been reported to trigger the recruitment of trkB to the cell surface (Meyer-Franke et al., 1998), thus an increase in the cAMP levels would lead to more trkB present in the plasma membrane due to both increased trkB synthesis and membrane insertion.

The reported gel shift experiments showed that the sequence containing the two putative CREs is specifically recognized by protein(s) present in neuronal or neuroblastoma (N2a-cerbA) nuclear extracts (Fig. 2) and that this specific binding is increased upon Fk stimulation (Fig. 2A). Previous reports have demonstrated that CREB is constitutively bound to DNA and that upon phosphorylation of Ser133, CREB transcriptional activity is induced (Gonzalez and Montminy, 1989). Interestingly, it has been shown that CREB binding to the consensus CRE element in the tyrosine aminotransferase (TAT) promoter is induced following phosphorylation of CREB by PKA (Nichols et al., 1992). The apparent dual nature of CREB binding (constitutive vs. inducible) is postulated to be due to the fact that there are two classes of CRE sites: symmetric CRE sites (such as the palindromic sequence TGACGTC A which contains two functional CGTCA units) and asymmetric CRE sites (which contain only one functional CGTCA unit) (Nichols et al., 1992). Genes such as somatostatin or BDNF contain a symmetric (high-affinity) CRE site to which CREB is constitutively bound by CREB. In contrast, asymmetric CRE sites, such as the sites found in the TAT and proenkephalin genes, are low affinity. As such, CREB binding to those low-affinity sites is induced following PKA-mediated phosphorylation (Nichols et al., 1992). Because the CRE sites located in the trkB promoter are both symmetric (CRE2) and asymmetric (CRE1), it is possible that after Fk treatment, the induction of the DNA-binding activity of CREB would increase the binding of this transcription factor to the asymmetric CRE1.

The protein composition of the retarded complex differs between neurons and N2a-cerbA cells, since only one major complex is formed in neurons and two in the neuroblastoma cells. Although we have not performed a detailed identification of the differential protein-protein interactions at the CREs sites in the trkB gene, we demonstrate the presence of CREB and ATF-1 in the supershift assays with N2a-cerbA cell extracts (Fig. 3B). In contrast, it appears that only CREB homodimers are present in cortical neurons. Both the activation of CREB and the presence of the trkB-CREs are essential to mediate Fk activation of the trkB promoter P2, since a blockade of CREB function or deletion of the trkB-CREs abolishes this activation in both N2a-cerbA cells (Fig. 5) and primary cortical neurons (Fig. 7). Our finding that CREB

plays a critical role on trkB transcriptional activation provides the molecular bases to understand the strong correlation that has been shown between increased CREB phosphorylation and stimulation of trkB expression, in many physiological and experimental conditions. Hence, hypoxic/ischemic-induced brain damage causes an increase in phospho-CREB immunoreactivity in rat dentate granule cells and neocortex (Walton et al., 1996), as well as increased trkB expression (Merlio et al., 1993; Narumiya et al., 1998). Chronic antidepressant administration increases the expression of CREB, BDNF, and trkB (Nibuya et al., 1995), in such manner that the regional distribution and time course for induction of CREB correspond to that for BDNF and trkB, suggesting that both genes are regulated by CREB activity. Indeed, BDNF is a target of CREB family members that mediate its activation by a  $\text{Ca}^{2+}$ /CRE element present in the BDNF exon III promoter (Shieh et al., 1998; Tao et al., 1998).

PKA plays a key role regulating trkB expression. Cotransfection of the -1600trkB-P2-luciferase fusion gene with the heat-stable inhibitor of the PKA, PKI, blocks Fk-dependent activation of the trkB gene showing that the Fk effect is mediated by an increase in cAMP and the subsequent activation of PKA. In addition, cotransfection with the catalytic subunit of PKA enhances reporter expression without additional Fk stimulation. Accordingly, expression of a mutant PKA regulatory subunit, unable to bind cAMP, blocks the Fk-induced luciferase activity, further demonstrating that PKA plays a key role regulating trkB expression (Fig. 6). The physiological relevance of our findings is remarkable, because PKA activation and trkB expression have been implicated in the induction of long-lasting LTP (L-LTP) in the hippocampus. Stimulation of L-LTP leads to a dramatic increase in trkB expression in hippocampal dentate granule neurons (Dragunow et al., 1997), which is associated to the translocation into the nucleus of active PKA and phosphorylation of CREB (Abel and Maniatis, 1989; Impey et al., 1996; Matsushita et al., 2001). Moreover, it has been recently shown that G-protein-coupled receptors can modulate neuronal activity in hippocampal neurons (Liu et al., 2003), and knockout of one of these receptors leads to impairment of LTP (Otto et al., 2001). Therefore, it is reasonable to speculate that changes in cAMP levels induced by activation of G-protein-coupled receptors could lead to the stimulation of trkB expression in the hippocampus. Thus, our results provide, for the first time, a molecular link for the regulation of trkB expression by PKA/CREB as part of the cellular machinery implicated in the strengthening of specific synapses, which occurs in long-lasting forms of LTP.

As previously mentioned, the CREs in the trkB promoter are of the two types: symmetric (CRE2) and asymmetric (CRE1). The CRE2 sequence has been shown to mediate  $\text{Ca}^{2+}$  responses in many other reported genes by binding members of the CREB transcription factor family (West et al., 2002), and it is identical to the CRE present in the BDNF gene (Tao et al., 1998). Indeed, during the preparation of the present manuscript, Kingsbury et al. (2003) have reported that depolarization increases trkB expression in mouse cortical neuronal cultures. This activation is mediated through the trkB-CREs and the trkB promoter 2. In contrast with our results, showing that Fk stimulates both the truncated and full-length receptors from the P2 promoter, they found that  $\text{Ca}^{2+}$  entry specifically stimulates the expression of the full-length receptor. Since transcription from the P2 promoter is not linked to any specific splicing and both isoforms are transcribed from this promoter (Barettino et al., 1999), their results suggests that

depolarization may also regulate the splicing mechanism leading to the expression of the full-length receptor. Contrary to BDNF gene, which can be induced by  $\text{Ca}^{2+}$  but not by cAMP, either  $\text{Ca}^{2+}$  (Kingsbury et al., 2003) or cAMP can activate the P2 promoter of trkB. Because multiple signaling pathways converge at the level of CREB, it will be interesting in the future to investigate the interplay between these different signaling pathways and the regulation of trkB expression. Hence, depending on the normal or pathological conditions and in response to various physiological signals, trkB expression could be differently regulated in neurons or other cell types.

## Experimental methods

### Cell culture and forskolin stimulation

#### Cortical neuron cultures

Primary cultures of cortical neurons were prepared from brain cortices of Wistar rats embryos (E18/E19). Fetuses were obtained under aseptic conditions, and the cerebral cortices were dissected free of meninges and mechanically dissociated in 1 ml of minimum essential medium (MEM, Invitrogen) supplemented with 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamicin, 2mM glutamine, 0.6% glucose, 10% fetal bovine serum (FBS), and 10% horse serum. The dissociated neurons were plated on 100-mm plates precoated with poly-D-lysine (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Sigma) and laminin (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Sigma) at a density of  $20 \times 10^6$  cells and maintained at 37°C in a humidified incubator with 5%  $\text{CO}_2$ . Two hours after plating, two sterile glass coverslips were placed on top of the cultures, and the cells were sandwiched between the coverslip and the bottom of the plate (Brewer and Cotman, 1989). Under these conditions, most of the cells are neurons on 5 days in vitro (DIV). To induce PKA activation, cells were stimulated on Day 5 with 30  $\mu\text{M}$  of Fk at different time points, using cells treated with solvent as a control. The day before stimulation, medium was changed to MEM supplemented as before but with 1% FBS and no horse serum.

#### Neuro 2a-cerba (N2a-cerba) cultures

N2a-cerba is a cell line obtained after retroviral infection of the parental line (N2a) to induce the expression of the thyroid hormone receptor alpha (*c-erba*). Inversely to the N2a cells, this new cell line expresses the full-length trkB isoform (Pastor et al., 1994). Cells were grown in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 50 U/ml penicillin, and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of streptomycin. Cells were plated at a density of  $25 \times 10^4$  cells per 35-mm dish on the day before transfection and at a density of  $8 \times 10^5$  cells per 100-mm plate 2 days before nuclear protein extraction. Cells were stimulated for different times with 30  $\mu\text{M}$  of Fk.

#### RNA analysis

##### Preparation of RNA

Total RNA was extracted from cultures of cortical neurons, unstimulated or stimulated with 30  $\mu\text{M}$  of Fk for different times, using “Tri Reagent” (Sigma). The RNA samples were treated with RNase-free DNaseI (10 units, Promega) to eliminate any contaminating genomic DNA and then reextracted and precipitated. RNA was quantified by spectrophotometry and checked by 1% agarose gel electrophoresis.



### RNAse protection assays

<sup>32</sup>P-labeled antisense riboprobes were prepared by in vitro transcription with T3 or T7 RNA polymerase using the MAXI-script In Vitro Transcription Kit (Ambion) in the presence of <sup>32</sup>P-α-CTP. The TrkB riboprobe is a *HincII*-Sca I 391-base pair (bp) fragment from rat trkB c-DNA (Middlemas et al., 1991) and protects two fragments of 391 bp (trkB full-length) and 238 bp (trkB truncated) (Lindfors et al., 1995). As loading control, an antisense cRNA probe detecting the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) transcript was synthesized using a fragment spanning nucleotides 196 to 357 of the rat GAPDH cDNA. RNase protection assays were performed using the RPAII Ribonuclease Protection Assay Kit (Ambion). In each reaction, 20 μg of total RNA extracted from cortical neurons was hybridized to the antisense trkB and GAPDH cRNA probes, as recommended by the manufacturer. Protected fragments were separated on 6% polyacrylamide sequencing gels that were dried and exposed to X-ray films at –70°C with intensifying screens. Densitometric analysis of the bands using the NIH Image analysis software was used to obtain the relative values for mRNA levels. Values obtained for trkB-protected fragments were normalized with the results obtained for the GAPDH probe.

### Western blot analysis

Cortical neurons were grown in 6-well plates at a density of  $3 \times 10^6$  cells per well in Neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin, and 2% B27 supplement (Invitrogen) and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. On Day 5 after plating, cells were stimulated with 30 μM of Fk for different times. Cells were harvested directly into 125 μl of boiling 1:4 Laemmli sample buffer; 25 μl of the total volume was loaded onto 6% or 8% SDS–PAGE gels. Western blotting was performed with ECL assay (Amersham Biosciences) using antibodies to the extracellular domain of trkB (Santa Cruz Biotechnology, H-181) at 1:500, anti-phospho-trkA (Tyr-490; Cell Signaling Technologies) at 1:500, and anti-β-actin (Sigma) at 1:10000.

### Transient transfections

#### Plasmids

The constructs long-P2 and short-P2 were generated by subcloning fragments spanning nucleotide -1606 or -871 to -325 referred to mouse trkB translation start site into a derivative of the promoterless pBLCAT-3 plasmid (see Fig. 4). These constructs only contained the promoter 2 (P2) of the trkB gene (Baretino et al., 1999). For analysis of the cAMP-dependent trkB activation of the P1 promoter, two other constructs were generated, long-P1 and short-P1, containing the fragments from -5130 or -2698 to -871, respectively, where the P2 promoter has been deleted. The reporter plasmid -1600trkB-P2-Luc, equivalent to long-P2, contains fragment -1606 to -325 subcloned into the pGL3-basic firefly luciferase vector (Promega Madison, WI). Construct -1600ΔCREs-trkB-P2-Luc, where the putative trkB–CREs (CTGCGTCAGcccT-CACGTCA) are deleted, was generated by the overlapping polymerase chain reaction (PCR) mutagenesis strategy. The mutated trkB promoter sequence from -1606 to -325 was inserted into the *XhoI* and *HindIII* sites of pGL3. The following oligonucleotide sequences were used: -1606.trkB sense: 5'-GGA CTC GAG CAC TTC TCT CTT GGC AGA AAC CC-3', which incorporates a *XhoI*

site; -325.trkB antisense: 5'-GGA AAG CTT TAT CGG TGC GCA CCT CAG GGC-3', which included a *HindIII* site; and two overlapping primers with the two trkB–CREs deleted: ΔtrkB,CREs (sense): 5'-GCC CCT GCT AGA TCT TCG CCA GCA GTA GCA GAG GC-3' and ΔCREs-trkB (antisense): 5'-CTG CTG GCG AAG ATC TAG CAG GGG CAG AAA CTC CAG AA-3'. The introduction of a *BglII* restriction site in the ΔCREs-trkB primers allowed quick confirmation of the mutation. To study the regulation of a heterologous promoter, 25-mer oligonucleotides with the sequence of the two CREs-trkB and their different mutations (see Table 1) were subcloned in plasmid pTK-Luc by using the 5'-*HindIII* and 3'-*XhoI* restriction sites. The fidelity of each construct was verified by automated sequencing in the Instituto de Investigaciones Biomedicas Core Facility.

Expression vectors for wild-type and mutant forms of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase (PKA and mtPKA, respectively) (Maurer, 1989), as well as for the heat-stable inhibitor of PKA (PKI) and a mutant form (mtPKI) (Day et al., 1989; Howard et al., 1991), were kindly provided by Dr. R.A. Maurer (Oregon Health Science University, Portland). Expression vectors for the dominant negative forms of CREB, K-CREB (Walton et al., 1992), and A-CREB (Ahn et al., 1998) were kindly granted by Dr. R.H. Goodman (Oregon Health Science University) and Dr. C. Vinson (The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore), respectively.

### Transfection experiments in N2a-cerbA cell line

N2a-cerbA cells were grown as above. Before transfection, medium was removed, and transfection was performed by the calcium phosphate method. Each 35-mm culture plate received 1 μg of the appropriate reporter construct, 1 μg of the internal control plasmid Rous sarcoma virus (RSV)-Luc, RSV-LacZ, CMV-LacZ or SV40-LacZ, and up to 1 μg of the different expression vectors. Total amount of the expression vectors transfected was always normalized with the addition of the corresponding empty expression vector. Sixteen to eighteen hours after DNA addition, the medium was replenished and Fk or solvent added for 6 h before harvesting for determination of β-galactosidase, luciferase, or CAT activities by standard procedures.

### Transfection experiments in cortical neurons

Cortical neurons were isolated as above and plated at a density of  $2.5 \times 10^5$  cells per well in 24-well plates, grown in Neurobasal medium supplemented as above. Five days after plating, cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), following the manufacturer's protocol. Each well received 0.5 μg of the internal control plasmid EF-LacZ and 0.5 μg of the appropriated reporter plasmid. Stimulations were performed 48 h after transfection.

### Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

#### Nuclear proteins extraction

Cortical neurons and N2a-cerbA cells were stimulated with 30 μM Fk for 4 h and scraped into 1.5 ml of cold phosphate-buffered saline (PBS). The cells were pelleted by centrifugation for 3 min at 4°C and 4000 rpm and then resuspended in 0.2 ml of hypo B buffer (10 mM Tris–HCl pH 7.4, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, and 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). The whole nuclei were then collected by a brief 15-s centrifugation. The nuclear pellets were resuspended in 0.2 ml lysis (LS) buffer (hypo B buffer, 0.4% NP-40) and placed for 10 min on ice. Nuclei were then

collected by centrifugation for 3 min at 4°C and resuspended in 20–40 µl of cold LS buffer (20 mM Tris–HCl pH 7.4, 29% glycerol, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0.7M KCl, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, and 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) and incubated for 30 min on ice to extract nuclear proteins. Cellular debris was removed by centrifugation for 30 min at 4°C, and the supernatants were aliquoted and stored frozen at –80°C. Protein amount was determined using the BCA Protein Assay Kit (Pierce).

#### Gel mobility shift assays (EMSA)

The probes corresponding to the trkB–CREs mutated trkB–CREs (M1, M2, and M3), and consensus CRE (C) sequences were synthesized as complementary oligodeoxyribonucleotide strands (Table 1) and labeled with T4 polynucleotide kinase according to standard procedures. Binding of CREB to these labeled probes was carried out in a 13.2-µl reaction mixture containing 10% glycerol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 20 mM HEPES pH 7.4, 5 mM DTT, 0.1% TritonX-100, 0.2 mg/ml poly(dI-dC), 5 µg of bovine serum albumin, and 10 µg of nuclear extract. In antibody supershift assays, reaction mixtures were preincubated with 2 µl of anti-CREB polyclonal antibody (New England Biolabs Cat. No. 9192), anti-ATF-1 (Santa Cruz, sc-243X), and anti-p53 (Santa Cruz sc-6243) for 40 min at room temperature and 1 h on ice before the addition of the labeled probe. For competition analysis, 5 min before the addition of the labeled probe, 1.2 µl of a solution containing a 50- or 100-fold molar excess of the specific trkB–CREs (W), cCRE (C), or unspecific (NS) unlabeled oligonucleotides was added to the reaction mixture kept on ice. The binding reaction was initiated by the addition of 1.2 µl of a solution containing approximately 50,000 cpm of the <sup>32</sup>P-labeled probe and continued for 15 min on ice. The entire volume was loaded onto a 6% polyacrylamide gel in TBE buffer. Gels were run in the same buffer in the cold at 250 V for 2 h 30 min in the competition assays or 4 h 30 min in supershift experiments. After electrophoresis, gels were dried and exposed to Kodak X-ray films.

#### Acknowledgments

We thank Dr. D. Baretino for the first identify of the putative CREs in the trkB promoter, Dr. M. Díaz-Guerra for carefully reading the manuscript and helpful discussion. This work was supported by grant to A.R.-P., from “Dirección General de Investigación Científica y Técnica” (Ministerio de Ciencia y Tecnología: SAF2001-1624). R.D. and G.E. were supported by predoctoral fellowships from “Ministerio de Ciencia y Tecnología” and “Comunidad Autónoma de Madrid,” respectively.

#### References

- Abel, T., Maniatis, T., 1989. Action of leucine zippers. *Nature* 341, 24–25.
- Ahn, S., et al., 1998. A dominant-negative inhibitor of CREB reveals that it is a general mediator of stimulus-dependent transcription of *c-fos*. *Mol. Cell. Biol.* 18, 967–977.
- Barbacid, M., 1994. The Trk family of neurotrophin receptors. *J. Neurobiol.* 25, 1386–1403.
- Baretino, D., et al., 1999. The mouse neurotrophin receptor trkB gene is transcribed from two different promoters. *Biochem. Biophys. Acta* 1146, 24–34.
- Bibel, M., Barde, Y.-A., 2000. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* 14, 2919–2937.
- Bothwell, M., 1995. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophins receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 18, 223–253.
- Brewer, G.J., Cotman, C.W., 1989. Survival and growth of hippocampal neurons in defined medium at low density: advantages of a sandwich culture technique or low oxygen. *Brain Res.* 494, 65–74.
- Day, R.N., et al., 1989. A protein kinase inhibitor gene reduces both basal and multihormone-stimulated prolactin gene transcription. *J. Biol. Chem.* 264, 431–436.
- Dragunow, M., et al., 1997. trkB expression in dentate granule cells is associated with a late phase of long-term potentiation. *Mol. Brain Res.* 46, 274–280.
- Gonzalez, G.A., Montminy, M.R., 1989. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59, 675–680.
- Howard, P., et al., 1991. Decrease catalytic subunit mRNA levels and altered catalytic subunit mRNA structure in a cAMP-resistant Chinese hamster ovary cell line. *J. Biol. Chem.* 266, 10189–10195.
- Impey, S., et al., 1996. Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 16 (5), 973–982.
- Insel, P.A., Ostrom, R.S., 2003. Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and G protein signaling. *Cell. Mol. Neurobiol.* 23 (3), 305–314.
- Kernie, S.G., et al., 2000. BDNF regulates eating behaviour and locomotor activity in mice. *EMBO J.* 19, 1290–1300.
- Kingsbury, T.J., et al., 2003. Ca(2+)-dependent regulation of trkB expression in neurons. *J. Biol. Chem.* 278 (42), 40744–40748.
- Klein, R., et al., 1989. trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J.* 8, 3701–3709.
- Klein, R., et al., 1990. The trkB neurotrophin tyrosine kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell* 61, 647–656.
- Klein, R., et al., 1991. The trkB tyrosine kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66, 395–403.
- Lindfors, N., et al., 1995. Spatiotemporal selective effects on brain-derived neurotrophic factor and trkB messenger RNA in rat hippocampus by electroconvulsive shock. *Neuroscience* 65 (3), 661–670.
- Lindsay, R.M., 1994. Neurotrophins and receptors. *Prog. Brain Res.* 103, 3–14.
- Liu, Z., et al., 2003. Frequency modulation of synchronized Ca<sup>2+</sup> spikes in cultured hippocampal networks through G-protein-coupled receptors. *J. Neurosci.* 23, 4156–4163.
- Lyons, W.E., et al., 1999. Brain-derived neurotrophic factor deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 15239–15244.
- Matsumita, M., et al., 2001. A high-efficiency protein transduction system demonstrating the role of PKA in long-lasting long-term potentiation. *J. Neurosci.* 21, 6000–6007.
- Maurer, R.A., 1989. Both isoforms of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit can activate transcription of the prolactin gene. *J. Biol. Chem.* 264, 6870–6873.
- Merlio, J.-P., et al., 1993. Increased production of trkB protein-tyrosine kinase receptor after brain insults. *Neuron* 10, 151–164.
- Meyer-Franke, A., et al., 1998. Depolarization and cAMP elevation rapidly recruits trkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron* 21, 681–693.
- Middlemas, D.S., et al., 1991. trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase, evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol. Cell. Biol.* 11, 143–153.
- Minichiello, L., et al., 1999. Essential role for trkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* 24, 401–414.

- Narumiya, S., et al., 1998. Enhanced expression of full-length trkB receptors in young rat brain with hypoxic/ischemic injury. *Brain Res.* 797, 278–286.
- Nibuya, M., et al., 1995. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J. Neurosci.* 15 (11), 7539–7547.
- Nibuya, M., et al., 1999. Repeated stress increases catalytic trkB mRNA in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 267, 81–84.
- Nichols, M., et al., 1992. Phosphorylation of CREB affects its binding to high and low affinity sites, implications for cAMP induced gene transcription. *EMBO J.* 11 (9), 3337–3346.
- Otto, C., et al., 2001. Impairment of mossy fiber long-term potentiation and associative learning in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor-deficient mice. *J. Neurosci.* 21, 5520–5527.
- Pastor, R., et al., 1994. Unliganded *c-erbA*/thyroid hormone receptor induces trkB expression in neuroblastoma cells. *Oncogene* 9, 1081–1089.
- Pombo, P.M.G., et al., 2000. Transcriptional repression of neurotrophin receptor trkB by thyroid hormone in the developing rat brain. *J. Biol. Chem.* 275, 37510–37517.
- Salin, T., et al., 1995. Up-regulation of trkB mRNA expression in the rat striatum after seizures. *Neurosci. Lett.* 194 (3), 181–184.
- Shieh, P.B., et al., 1998. Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* 20, 727–740.
- Stoilov, P., Castren, E., Stamm, S., 2002. Analysis of the human trkB gene genomic organization reveals novel trkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 1054–1065.
- Tao, X., et al., 1998.  $\text{Ca}^{2+}$  influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20, 709–726.
- Walton, K.M., et al., 1992. A dominant repressor of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-regulated enhancer binding protein activity inhibits the cAMP-mediated induction of the somatostatin promoter in vivo. *Mol. Endocrinol.* (6), 647–655.
- Walton, M., et al., 1996. The role of the cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) in hypoxic-ischemic brain damage and repair. *Mol. Brain Res.* 43, 21–29.
- West, A.E., et al., 2002. Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nat. Rev., Neurosci.* 3, 921–931.
- Xu, B.J., et al., 2000. Cortical degeneration in the absence of neurotrophin signaling: dendritic retraction and neuronal loss after removal of the receptor trkB. *Neuron* 26, 236–245.

# Transcription of the NR1 Subunit of the *N*-Methyl-D-aspartate Receptor Is Down-regulated by Excitotoxic Stimulation and Cerebral Ischemia\*

Received for publication, April 15, 2005, and in revised form, July 22, 2005 Published, JBC Papers in Press, July 27, 2005, DOI 10.1074/jbc.M504108200

Sergio Gascón<sup>†1</sup>, Rubén Deogracias<sup>‡2</sup>, Mónica Sobrado<sup>§3</sup>, José M. Roda<sup>§</sup>, Jaime Renart<sup>‡</sup>, Ángeles Rodríguez-Peña<sup>‡</sup>, and Margarita Díaz-Guerra<sup>†4</sup>

From the <sup>†</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols,” CSIC-UAM, Arturo Duperier, 4, 28029 Madrid, Spain and the

<sup>§</sup>Unidad de Investigación Cerebrovascular, Hospital La Paz, 28029 Madrid, Spain

The *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) type of glutamate receptor (NMDAR) plays central roles in normal and pathological neuronal functioning. We have examined the regulation of the NR1 subunit of the NMDAR in response to excessive activation of this receptor in *in vitro* and *in vivo* models of excitotoxicity. NR1 protein expression in cultured cortical neurons was specifically reduced by stimulation with 100  $\mu$ M NMDA or glutamate. NMDA decreased NR1 protein amounts by 71% after 8 h. Low NMDA concentrations ( $\leq 10$   $\mu$ M) had no effect. NR1 down-regulation was inhibited by the general NMDAR antagonist DL-AP5 and also by ifenprodil, which specifically antagonizes NMDARs containing NR2B subunits. Arrest of NMDAR signaling with DL-AP5 after brief exposure to NMDA did not prevent subsequent NR1 decrease. Down-regulation of NR1 did not involve calpain cleavage but resulted from a decrease in *de novo* synthesis consequence of reduced mRNA amounts. In contrast, NMDA did not alter the expression of NR2A mRNA or newly synthesized protein. In neurons transiently transfected with an NR1 promoter/luciferase reporter construct, promoter activity was reduced by 68% after 2 h of stimulation with NMDA, and its inhibition required extracellular calcium. A similar mechanism of auto-regulation of the receptor probably operates during cerebral ischemia, because NR1 mRNA and protein were strongly decreased at early stages of blood reperfusion in the infarcted brains of rats subjected to occlusion of the middle cerebral artery. Because NR1 is the obligatory subunit of NMDARs, this regulatory mechanism will be fundamental to NMDAR functioning.

The *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)<sup>5</sup> type of glutamate receptor (NMDAR) plays key roles in neuronal plasticity, learning, and memory in the central nervous system, most of which are related to its high permeability to Ca<sup>2+</sup> (1). However, excessive activation of NMDARs

induces excitotoxic cell death and contributes to neuronal degeneration in hypoxia, ischemia, and several neurodegenerative pathologies (2).

Functional NMDARs are hetero-oligomeric proteins composed of an obligatory NR1 subunit (3–7) and NR2 subunits, denoted A–D (3, 4, 8, 9). It is these NR2 subunits that confer functional variability to the receptor. In the post-synaptic membrane, NMDARs form large and dynamic signaling complexes by association with additional proteins (10), although there are also extrasynaptic NMDARs, which trigger different responses (11).

NMDARs are subjected to multiple levels of regulation, affecting subunit expression, subcellular location, and the assembly of functional receptors and their signaling complexes (12–17). The NR1 gene is expressed in virtually all neurons, whereas NR2 transcripts display developmental and regional patterns (5, 18). The NR1 gene is transcriptionally up-regulated during neuronal differentiation, mostly by promoter de-repression (19), although positive mechanisms are also required. Post-transcriptional mechanisms also contribute to NR1 regulation in brain development, and two pools of mRNA, with different translational activities, have been described (20). In addition, an important level of control is exerted at the level of protein turnover and trafficking. There is a close coordination in neurons between the assembly of functional heteromeric receptors and the fate of the individual subunits, as exemplified by the existence of two pools of NR1 protein that are differently assembled to the NR2 subunits and that have distinct turnover rates (21–23).

This dynamic regulation of NMDAR expression and function is highly sensitive to activation of the receptors by their ligands; activation-dependent targeting and trafficking of NMDARs to and from synapses is fundamental to synaptic maturation and plasticity and is driven by mechanisms that accurately regulate receptor number (12, 24). We are interested in how NMDAR expression and function are affected by overactivation of this receptor by excitotoxic brain insults. In cultured neurons and during forebrain ischemia, excitotoxicity induces C-terminal cleavage of the NR2A and NR2B subunits (25–27). This cleavage is mediated by the Ca<sup>2+</sup>-dependent protease calpain and might represent a negative feedback mechanism to down-regulate NMDAR function. Such a possibility is supported by the significant reduction in whole cell NMDAR-mediated currents induced by prolonged stimulation of acutely isolated or cultured cortical neurons with glutamate or NMDA (27). However, the role of NR1 subunits in the response to NMDAR overactivation has remained to be established.

In this study, we have examined the effect of NMDAR overstimulation on NR1 expression *in vitro* and *in vivo*. We show that brief exposure of cortical neurons to excitotoxic concentrations of NMDA provokes a rapid, specific, and irreversible inhibition of NR1 transcription via a mechanism that requires the activation of receptors containing the

\* This work was supported by Grants SAF2003-02327 (to M. D.-G.), SAF2001-1624 (to A. R.-P.) and PM99-0115 (to J. R.) from the “Dirección General de Investigación Científica y Técnica” (Ministerio de Ciencia y Tecnología).

<sup>1</sup> Recipient of a predoctoral fellowship from the Comunidad de Madrid.

<sup>2</sup> Recipient of a predoctoral fellowship from Ministerio de Ciencia y Tecnología.

<sup>3</sup> Recipient of a predoctoral fellowship from Fundación Teófilo Hernando. Present address: Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols,” CSIC-UAM, Arturo Duperier, 4, 28029-Madrid, Spain.

<sup>4</sup> Researcher of the Ramón y Cajal Program. To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-91-5854448; Fax: 34-91-5854401; E-mail: mdiazguerra@iib.uam.es.

<sup>5</sup> The abbreviations used are: NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; NMDAR, NMDA receptor; Cilll, carbobenzoxy-valinyl-phenylalaninal; CREB, cAMP response element-binding protein; DL-AP5, 2-amino-phosphonopentanoic acid; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; MCAO, middle cerebral artery occlusion; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium; BAPTA-AM, 1,2-bis-(*o*-aminophenoxy)-ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid tetra(acetoxymethyl)ester; NSE, neuronal specific enolase; PBS, phosphate-buffered saline; RIPA, radioimmune precipitation assay; MOPS, 4-morpholinepropanesulfonic acid.



NR2B subunit. Strong decreases in NR1 mRNA and protein were also observed during the reperfusion of infarcted rat brains. Given that the NR1 subunit is an essential component of the NMDAR, any modification of its expression will likely have a significant impact on receptor function. Our results thus reveal a new and important mechanism of autoregulation of the receptor by its agonist.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals**—The NMDAR antagonists 2-amino-phosphonopentanoic acid (DL-AP5) and ifenprodil were from Tocris-Cookson (Bristol, UK). NMDA, glutamate, glycine, cytosine  $\beta$ -D-arabinofuranoside, actinomycin D, poly-L-lysine, L-laminin, and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) were all from Sigma. Carbobenzoxy-valinyl-phenylalaninal (calpain inhibitor III, herein after referred to as CIII) and 1,2-bis-(*o*-aminophenoxy)-ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid tetra(acetoxymethyl)ester (BAPTA-AM) were from Calbiochem (Darmstadt, Germany).

**Primary Neuronal Culture**—Primary culture of embryonic rat neurons was essentially as described (28) with some modifications. The plates were treated with poly-L-lysine (100  $\mu$ g/ml) and laminin (4  $\mu$ g/ml) overnight at 37 °C before seeding. Cerebral cortices from 18-day-old rat embryos (Wistar) were dissected and mechanically dissociated in culture medium (Eagle's minimum medium supplemented with 28.5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 22.2 mM glucose, 0.1 mM glutamine, 5% fetal bovine serum, and 5% donor horse serum). The cells were seeded at a density of  $0.3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> in the same medium. To inhibit growth of glial cells, cytosine  $\beta$ -D-arabinofuranoside (10  $\mu$ M) was added to the culture at day 7 and maintained until the end of experiments.

Experimental treatments were begun after 14 days in culture, at which time NR2A and NR2B subunits are both expressed. The following concentrations of reagents were used for pretreatments or treatments, as indicated under "Results": 100  $\mu$ M NMDA, 10  $\mu$ M glycine, 100  $\mu$ M glutamate, 200  $\mu$ M DL-AP5, 10  $\mu$ M ifenprodil, 10  $\mu$ M CIII, 40  $\mu$ M BAPTA-AM, 2 mM EGTA, and 2.5  $\mu$ g/ml actinomycin D. Excitotoxicity was always induced by combined treatment with either NMDA or glutamate and the co-agonist glycine.

**Assessment of Neuronal Injury**—We used the MTT reduction assay to measure cell viability. MTT (0.5 mg/ml) was added to the medium, and after 4 h at 37 °C the formazan salts formed were solubilized in 5 mM HCl containing 5% SDS and were spectrophotometrically quantified at 570 nm. The contribution to the absorbance of glial cells in the mixed cultures was established by exposing sister cultures to 400  $\mu$ M NMDA and 10  $\mu$ M glycine for 24 h before MTT assay. These conditions induce nearly complete neuronal death but no glial damage. Once these values were subtracted, we calculated the viability of stimulated neurons relative to the untreated ones.

**Immunoblot Analysis**—The cultures were lysed in RIPA buffer (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycolate, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS) containing protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.2 mM 1,10-phenanthroline, 10  $\mu$ g/ml pepstatin A, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, and 10 mM benzamidine). Brain samples were homogenized in RIPA buffer containing 1% SDS, 1 mM dithiothreitol, and protease inhibitors as above. Protein concentrations were determined with the BCA reagent from Pierce. Equal amounts of protein (25–50  $\mu$ g) were separated by polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Pall; Life Sciences).

Immunodetection of proteins was performed by standard procedures. NR1 expression was detected with an anti-NMDAR NR1 monoclonal antibody (Pharmingen, San Diego, CA). Polyclonal antibodies

were used to detect neuronal specific enolase (NSE) (ICN Biomedicals) and conserved regions in the N terminus (Pharmingen) and C terminus (Chemicon, Temacula, CA) of NMDAR subunits NR2A and 2B. Protein loading was monitored by comparison with the staining with an anti- $\beta$ -actin monoclonal antibody (Sigma). Goat secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Immunocomplexes were detected with the Bioluminescence kit from PerkinElmer Life Sciences. Densitometric analysis of bands was performed with NIH Image analysis software.

**Immunofluorescence**—Primary cultures were grown on coverslips treated with poly-L-lysine and L-laminin as before. After stimulation with NMDA and glycine as indicated, they were fixed for 2 min at 4 °C in 4% (w/v) paraformaldehyde in phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS), washed with PBS, and permeabilized for 2 min at –20 °C in methanol. Nonspecific sites were blocked for 30 min at room temperature in 10% (v/v) horse serum, 0.1% (v/v) Triton X-100 in PBS, and the same solution was used for antibody dilution.

The cells were incubated with the monoclonal antibody for NR1 for 1 h at room temperature and, after washes, with an Alexa-488 conjugated secondary antibody for a further hour. Nuclear DNA was labeled with 2  $\mu$ M TO-PRO 3 iodide (Molecular Probes) added to the secondary antibody solution. The coverslips were mounted in Fluoromount-G (SouthernBiotech), and immunoreactivity was detected by examination under a Radiance 2000 confocal microscope (Bio-Rad) coupled to an inverted Axiovert S100 TV microscope (Zeiss) fitted with a 63 $\times$  Plan-Apochromat oil immersion objective. Overlaying the NR1 and TO-PRO 3 images produced the two-color merged image.

**Metabolic Labeling and Immunoprecipitation**—The cells were starved for 3 h in Dulbecco's modified Eagle's medium without methionine or cysteine (Biowhittaker) and containing 200  $\mu$ M DL-AP5. They were then labeled for 4 h with 150  $\mu$ Ci/ml of [<sup>35</sup>S]methionine + cysteine, washed with cold PBS, and lysed in RIPA buffer as before. When indicated, NMDA and glycine were present during starvation and labeling.

The trichloroacetic acid-precipitable counts in the extracts were measured, and equivalent counts were incubated with the following antibodies: anti-NR1 (2.5  $\mu$ g); anti-NR2A/B (C-ter) (0.5  $\mu$ g); or a rabbit polyclonal specific for calnexin (0.5  $\mu$ l) (StressGen Biotechnologies, Victoria, Canada). The immunocomplexes were precipitated with 100  $\mu$ l of 10% Protein A Sepharose (Sigma), and the beads were washed four times with RIPA buffer before solubilization in sample buffer.

**Northern Blot Analysis**—Total RNA was prepared using TriReagent (Sigma) according to the manufacturer's instructions. Approximately 10  $\mu$ g of total RNA were fractionated on 1% agarose gels prepared in 20 mM MOPS buffer, pH 7.2, 0.6% formaldehyde. After transfer to nylon membranes, the RNA was hybridized to DNA probes corresponding to nucleotides 34–378 of rat  $\beta$ -actin cDNA or nucleotides 344–1280 of the NR1-1a splice variant, labeled by standard procedures.

**RNase Protection Assay**—Total RNA was treated with RNase-free DNase I (10 units, Promega) to eliminate any contaminating genomic DNA and then extracted and precipitated. RNA was quantified by spectrophotometry and checked by 1% agarose gel electrophoresis.

Antisense riboprobes were prepared by *in vitro* transcription with T3 or T7 RNA polymerase in the presence of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP, by use of the MAXIscript *in vitro* transcription kit (Ambion). The probe used for NR1 spans nucleotides 1250–1556 of the rat NR1 cDNA and corresponds to exons 7–9; that used for NR2A spans nucleotides 2442–2683 of the rat NR2A cDNA. As a loading control, we synthesized an antisense cRNA probe spanning nucleotides 196–357 of the rat glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA.

## Down-regulation of NR1 by NMDAR Activation

RNAse protection assays were performed with the RPAII ribonuclease protection assay kit (Ambion). Total RNA from brain cortices or cultured neurons (15–20  $\mu$ g) was hybridized to NR1 or NR2A probes together with GAPDH cRNA. Protected fragments were separated on 6% polyacrylamide sequencing gels, which were dried and exposed to x-ray films. Quantitation was performed with a Packard Instantimager, and the values were normalized to those obtained for GAPDH.

**Quantitative Real Time PCR**—Total RNA (2  $\mu$ g) was transcribed in reverse by extension of random hexamers with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega). PCRs (20  $\mu$ l) contained 0.5  $\mu$ l of cDNA, 0.05 units of Taq polymerase (Biotools), 0.2 mM dNTPs, 0.2  $\mu$ M amplification primers, 1:40000 Sybr Green, and 3 mM  $MgCl_2$ . The PCR was performed in a Rotor-Gene 2000 thermocycler (Corbett Research, Sidney, Australia). Denaturation at 95 °C for 2 min was followed by 35 cycles of 95 °C for 20 s, 62 °C for 20 s, and 72 °C for 30 s.

The NR1 forward primer spanned nucleotides 1473–1493 of the cDNA (5'-TCCACCAAGAGCCCTTCGTG), and the reverse primer spanned nucleotides 1541–1561 (5'-AGTTCAACAATCCGAAAAGCTGA). The 108-bp region amplified by this primer set is common to all NR1 isoforms. NR1 transcript amplification was normalized against NR2A; the forward primer spanned nucleotides 1250–1270 (5'-ACGACTGGGACTACAGCCTG), and the reverse primer spanned nucleotides 1344–1364 (5'-CTTCTCTGCCTGCCCATAGC), amplifying a 134-bp region of the NR2A cDNA.

**Cell Transfection and Gene Reporter Assay**—The plasmids pNRL5.4 (19) and 356 (29) were kindly provided by Dr. Guang Bai, and contain, respectively, 5.4-kb and 356-bp sequences of the rat NR1 promoter cloned upstream of the firefly luciferase reporter gene. Plasmid pRL-SV40 (Promega) contains the SV40 early enhancer/promoter region in control of the constitutive expression of *Renilla* luciferase.

Neurons cultured for 12 days were transfected plasmid DNA incorporated into Lipofectamine 2000 liposomes (Invitrogen). DNA-liposomes complexes were prepared in neurobasal medium (Invitrogen), with the NR1 promoter plasmids in a 5:1 molar excess over pRL-SV40. Two hours after addition to cells, the liposomes were removed, and the neurons were fed with conditioned medium. In control experiments, the efficiency of transfection was estimated to be around a 15%. After transfection, the cells were maintained in culture for 40 h before experimental treatments.

When indicated, the cells were pretreated for 2 h before stimulation with CiIII or with one of the  $Ca^{2+}$  chelators BAPTA-AM or EGTA. The cells were stimulated for the indicated times with NMDA/glycine, with or without DL-AP5 or ifenprodil. In the experiments with the  $Ca^{2+}$  chelators, after stimulation with NMDA/glycine for 1 h, the cells were washed, fed with conditioned medium plus DL-AP5, and analyzed 24 h later. Reporter gene activities were determined by the dual luciferase reporter assay system from Promega; firefly luciferase activity was normalized to the *Renilla* values obtained in the same sample.

**Animal Model of Cerebral Ischemia**—All of the animal procedures were performed in compliance with European Community law 86/609/EEC and were approved by the ethics committee of the Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Male Sprague-Dawley rats (275–300 g) were anesthetized by intraperitoneal injection with a solution of diazepam (5 mg/kg), ketamine hydrochloride (Ketolar, 62.5 mg/kg), and atropine (0.25 mg/kg). The femoral artery was cannulated for continuous monitoring of arterial pressure and blood sampling. Analysis of blood pH, gases, and glucose was performed before and 15 min after occlusion and 10 min after reperfusion. Body and brain temperatures were respectively maintained at  $37 \pm 0.5$  °C and  $36 \pm 0.5$  °C during the whole procedure.

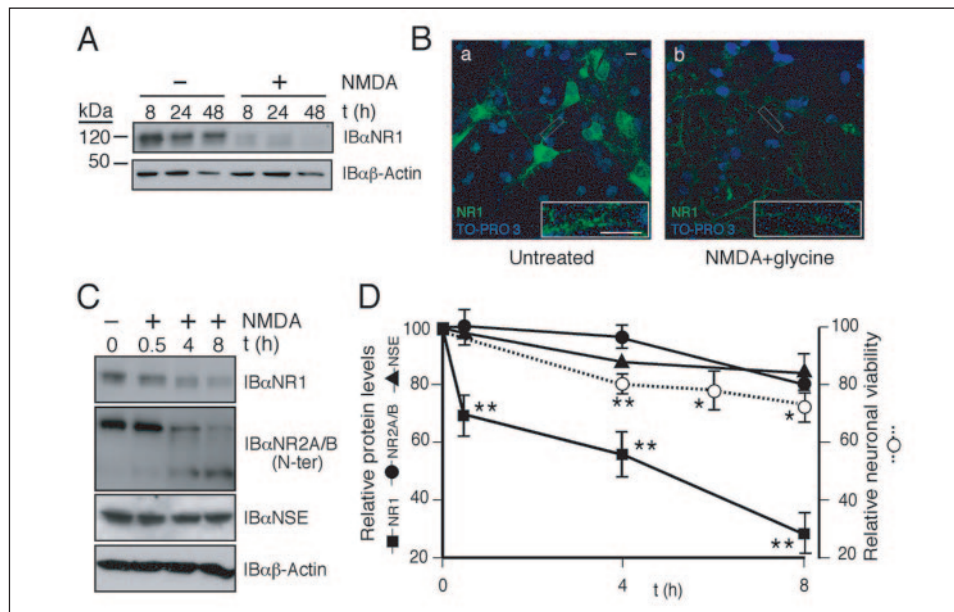
The surgical procedure was a variant of that described by Chen *et al.* (30) and Liu *et al.* (31). A small craniectomy was made over the trunk of the right middle cerebral artery and above the rhinal fissure, and the artery was transitorily ligated with a 9–0 suture just before its bifurcation into the frontal and parietal branches. Complete interruption of blood flow was confirmed by observation under an operating microscope. Then both common carotid arteries were also occluded, and all three arteries were kept this way for 60 min before reperfusion. After blood reperfusion for the indicated times, the animals were sacrificed by an inhaled overdose of halotane and decapitated. Sham-operated animals were subjected to anesthesia and surgical procedure but the occlusion of the arteries was omitted.

For the protein extracts, the brain was sectioned into 2-mm-thick slices and stained with a 2% solution of triphenyltetrazolium chloride. The unstained area of the cerebral cortex (right hemisphere), defined as infarcted tissue, was dissected; the corresponding contralateral region in the left hemisphere was also dissected for comparison. To prepare RNA, dissection of the infarcted and contralateral cortical tissue was performed directly in whole brain, and the samples were immediately frozen in liquid nitrogen until further use. For immunohistochemistry, 24 h after blood reperfusion, the rats were deeply anesthetized as before and perfused intracardially with cold 4% paraformaldehyde in PBS. The brains were removed immediately and post-fixed in the same fixative at 4 °C for an additional 24 h. They were then cryoprotected by serial immersion for at least 6 h in increasing concentrations of sucrose (10, 15, and 20%) in PBS at 4 °C. Frozen coronal sections (25  $\mu$ m thick) were then prepared in a cryostat (Leica, Heidelberg, Germany) and processed for immunohistochemistry.

**Immunohistochemistry**—The infarcted tissue in the neocortex was identified by Nissl (0.1% (w/v) cresyl violet) staining of slide-mounted coronal sections. Adjacent sections were then processed for immunofluorescence. Briefly, the sections were permeabilized and blocked by treatment with 5% (v/v) sheep serum and 0.3% (v/v) Triton X-100 in PBS for 1 h at room temperature. This same solution was used for antibody dilution; washes were performed in 0.3% (v/v) Triton X-100 in PBS. The sections were incubated overnight at 4 °C with the NR1 monoclonal antibody (1:100). After several washes, the sections were incubated at room temperature for 60 min with the Alexa Fluor 568-conjugated anti-mouse IgG secondary antibody (1:400) (Molecular Probes, Eugene, OR). After further washes, the sections were counterstained for 1 h at room temperature with 2  $\mu$ M TO-PRO 3 iodide (Molecular Probes) before mounting in Fluoromount-G solution (SouthernBiotech). Parallel controls without primary antibody showed very low levels of nonspecific staining. Confocal images were acquired as described above.

## RESULTS

**Excitotoxic Activation of the NMDAR Down-regulates Expression of the NMDAR NR1 Subunit in Vitro**—In this investigation, we have characterized the effect that activation of the NMDAR has on the expression of NR1, a critical subunit of this glutamate receptor. Primary cultured rat cortical neurons of 14 days *in vitro* were incubated with NMDA (100  $\mu$ M) and the co-agonist glycine (10  $\mu$ M), and steady-state NR1 protein levels were determined by immunoblot analysis with a monoclonal antibody directed to an extracellular domain of this protein (Fig. 1A). Compared with untreated cells, there was a marked decrease in NR1 immunoreactivity after 8 h of agonist treatment. This effect was further accentuated by longer treatment, with NR1 protein nearly undetectable after 48 h. NMDA had no effect on the expression levels of the unrelated protein  $\beta$ -actin at any time tested.



**FIGURE 1. Specific decrease of NR1 protein expression in cortical neurons stimulated with NMDA.** *A*, primary cultures of rat cortical neurons (14 days *in vitro*) were incubated with NMDA (100  $\mu$ M) and glycine (10  $\mu$ M) for 8, 24, and 48 h, and immunoblot (IB) analysis was used to determine expression levels of the NR1 subunit and  $\beta$ -actin. Time-matched untreated cells were used as controls. *B*, primary cultures were stimulated with NMDA and glycine for 8 h or left untreated. Confocal immunofluorescence analysis was used to detect NR1 (green) and cell nuclei, which were revealed by co-staining with TO-PRO 3 (blue). The confocal microscopy images correspond to a single section, and details of the cell dendrites are shown in the insets. The results are representative of three independent experiments. The scale bars represent 10  $\mu$ m. *C*, neurons were stimulated with NMDA and glycine for 30 min, 4 h, or 8 h. Untreated cells were used as the control. The immunoblots show the expression levels of NR1, NR2A/B (N-ter), NSE, and  $\beta$ -actin. *D*, quantitation of the decline of NR1 protein expression and of neuronal viability with time of NMDA/glycine treatment. Expression levels of NR1 (filled squares), NR2A/B (115-kDa fragment and full-length combined: filled circles), and NSE (filled triangles) were measured by densitometric analysis of immunoblots with NIH Image software. Protein levels are expressed as the percentage of the value in untreated cells. Neuronal viability was measured by MTT assay and is similarly expressed relative to untreated cells (open circles). The contribution of glial cells to MTT assay was excluded (see "Materials and Methods"). The data are the means  $\pm$  S.D. of three independent experiments. Statistical differences between treated and untreated cells were assessed by the Student's unpaired *t* test. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

Immunofluorescence of primary cultures confirmed these results (Fig. 1*B*). In untreated cells (Fig. 1*B*, panel *a*), we observed a characteristic immunoreactivity for this protein in the cell soma and in clusters at puncta on dendrites (inset). Staining of nuclear DNA with TO-PRO 3 iodide revealed the presence in the primary cultures of glial cells, which do not express NMDAR proteins. Stimulation with NMDA and glycine for 8 h induced a marked decrease in the intensity of staining (Fig. 1*B*, panel *b*), both in cell bodies and dendrites.

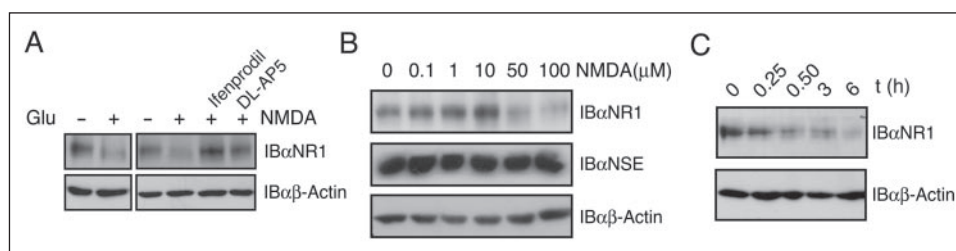
To exclude the possibility that the observed decrease was a consequence of neuronal cell death, we examined the expression of NR1 and other neuron-specific proteins at earlier times of treatment and measured neuronal viability by MTT assay. Immunoblot analysis was performed on neurons treated with NMDA from 30 min to 8 h (Fig. 1*C*), and the results from three independent experiments were quantified (Fig. 1*D*). Thirty minutes of NMDA stimulation were enough to significantly reduce NR1 band density by 29% compared with untreated cells ( $p < 0.01$ ). By 4 and 8 h of treatment, NR1 band densities were, respectively, 43 and 71% below that from control cells ( $p < 0.01$ ). In accordance with published results (25, 26), the NR2A and B subunits were cleaved, and a 115-kDa fragment recognized by an antibody specific for the N-terminal region of NR2A and NR2B appeared (Fig. 1*C*). However, after 8 h there was no statistically significant decrease in the combined levels of truncated and full-length NR2 proteins (Fig. 1*D*). There was similarly no significant decrease in the expression of NSE and  $\beta$ -actin. It thus seems that the NMDA-induced decrease in NR1 protein is not part of a general effect of neuronal death resulting from NMDAR activation, and this is further supported by the MTT assay, which estimated excitotoxic death to be only 25% after 8 h of NMDA treatment (Fig. 1*D*). However, the neurons in our cultures were committed to die, as shown by the progressive increase in neuronal death observed at later times of NMDA treatment (data not shown).

**NR1 Down-regulation by Brief Overstimulation of NMDARs Requires NR2B Subunits and Is Irreversible**—To investigate the receptor components required for NR1 down-regulation, we first examined the effects of different NMDAR agonists and antagonists (Fig. 2*A*). Glutamate (100  $\mu$ M in combination with 10  $\mu$ M of the co-agonist glycine) decreased NR1 expression similarly to NMDA, and the specific competitive NMDAR antagonist DL-AP5 prevented NMDA-mediated NR1 down-regulation. These findings confirmed that NR1 down-regulation was agonist-specific and mediated by direct activation of the NMDARs. But NR1 down-regulation was also prevented by ifenprodil (10  $\mu$ M), which is a selective inhibitor of the NR2B subunits (32). Because neurons at this time in culture (14 days *in vitro*) express both NR2A and NR2B, we conclude that NR1 regulation specifically requires activation of NMDARs containing NR2B subunits. The amount of NR1 protein was not significantly modified in neurons treated only with DL-AP5 or ifenprodil compared with the untreated cells (data not shown), suggesting that basal activity of the NMDAR does not induce the down-regulatory process.

Therefore, we next analyzed the concentrations of NMDA required for regulation of NR1 expression. When cortical neurons were incubated for 6 h with different concentrations of NMDA (0.1–100  $\mu$ M) (Fig. 2*B*), decreased NR1 expression was observed only at concentrations higher than 10  $\mu$ M, suggesting that NR1 down-regulation requires excitotoxic stimulation of the NMDAR. A nonlinear response to NMDA concentration has been previously described in the neuronal injury induced by long term treatment with this agonist (33).

In agreement with these results, a chronic but nonexcitotoxic increase in the NMDAR activity of the primary neuronal cultures did not down-regulate the expression of the NR1 subunit. We increased NMDAR activity by blocking inhibitory synaptic inputs for 48 h with the  $\gamma$ -aminobutyric acid, type A receptor antagonist bicuculline (40  $\mu$ M). As shown before for hippocampus cells (34), this treatment did not signif-





**FIGURE 2. Irreversible down-regulation of NR1 by excitotoxic stimulation of NMDARs containing NR2B subunits.** A, the effect of different NMDAR agonists and antagonists on NR1 expression. Primary cultures were incubated for 12 h with glutamate (Glu) (100  $\mu$ M) or NMDA (100  $\mu$ M), each in combination with the co-agonist glycine (10  $\mu$ M). Where indicated, the cells were also treated with the antagonists DL-AP5 (200  $\mu$ M) or ifenprodil (10  $\mu$ M). NR1 and  $\beta$ -actin protein expression levels were determined by immunoblot (IB). B, neurons were stimulated for 6 h with glycine (10  $\mu$ M) and a range of concentrations of NMDA from 0.1 to 100  $\mu$ M. Expression levels of NR1, NSE, and  $\beta$ -actin were determined by immunoblot. C, cultures were incubated with NMDA/glycine for the indicated times before the addition of DL-AP5 (200  $\mu$ M) and then left to complete 24 h. Untreated cells were used as the control. The expression levels of NR1 and  $\beta$ -actin were determined by immunoblot.

icantly change the total amounts of NR1 in the cortical neurons (data not shown). However, high concentrations of NMDA were able to down-regulate NR1 expression irreversibly after only brief overstimulation of the NMDAR (Fig. 2C). When neurons were stimulated with NMDA for 15 min, and the signaling was then arrested by protecting receptor sites with DL-AP5, the protein levels of NR1 detected by immunoblot 24 h later were reduced by 25% compared with non-NMDA-treated cells. Arrest of signaling after 30 min of treatment produced a 49% decrease in NR1, which is similar to the decrease observed after 5 h of continuous stimulation (Fig. 1D). We therefore conclude that the down-regulation of NR1 is triggered during a short critical period after overstimulation of NMDARs, after which it cannot be blocked or reversed by antagonists.

**Down-regulation of NR1 Protein Expression Is Independent of Calpain and Is Mediated by a Decrease in NR1 mRNA**—Activation of the NMDAR in cultured hippocampal or cortical neurons leads to a rapid calpain-specific proteolysis of the C termini of the NR2A and NR2B subunits (25–27). We used two approaches to investigate whether this activity is also responsible of the decrease in NR1 induced by NMDA. We first analyzed whether the reduction in full-length NR1 was accompanied by the appearance of truncated forms of this protein. We performed immunoblot analysis of NR1 in neurons treated with NMDA for 8 h (Fig. 3A). The monoclonal antibody specific for NR1 recognizes an extracellular domain, so calpain cleavage of the cytosolic C-terminal domain would be expected to yield detectable N-terminal fragments. Contrary to this, the decrease in levels of full-length protein occurred without the appearance of N-terminal fragments, suggesting that calpain is not involved in the mechanism of NR1 down-regulation. To confirm this, we analyzed the effect on NR1 down-regulation of pretreatment with the CiIII. Calpain activity was not required for NR1 down-regulation, detected after 12 h of NMDA treatment, whereas it was required for the down-regulation of full-length NR2A/B (Fig. 3B) observed with an antibody directed to the C terminus and unable to detect the calpain products. Experiments performed with specific inhibitors also excluded the participation of the lysosomal or proteasomal degradative pathways in the down-regulation of NR1 induced by NMDA (data not shown). Considering these data and the relatively slow kinetics of NR1 reduction (Fig. 1D), we next addressed the possibility that overstimulation of the NMDAR inhibits *de novo* synthesis of NR1 protein. Untreated and NMDA-treated cortical neurons were metabolically labeled with [ $^{35}$ S]cysteine + methionine, and an equal number of counts immunoprecipitated using specific antibodies (Fig. 3C). We observed similar levels of synthesis of the neuronal proteins calnexin or NR2A/B in NMDA-treated or untreated cells, whereas this treatment blocked *de novo* synthesis of NR1 protein.

One explanation for this effect might be a reduction by NMDAR overactivation of the expression of one or more of the NR1 transcripts.

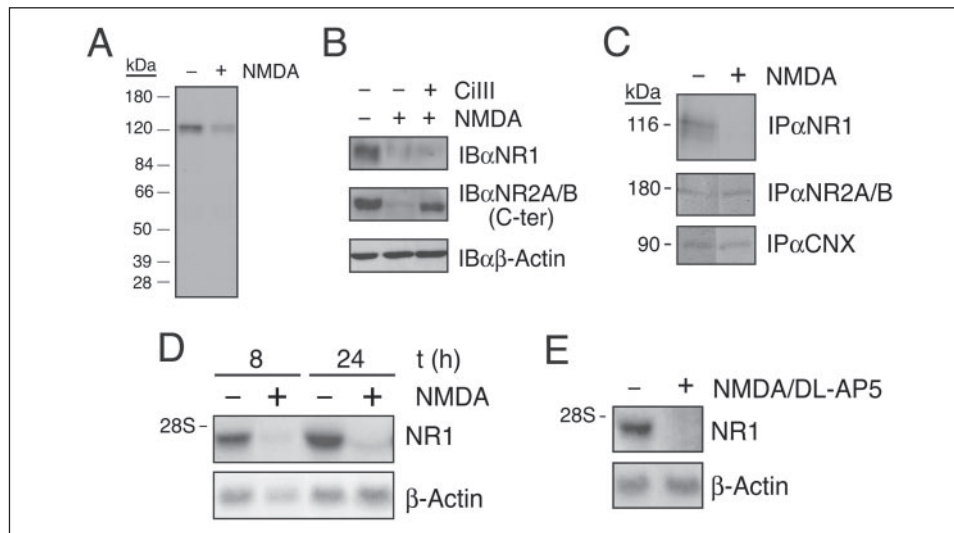
Northern blot analysis with a specific DNA probe able to detect all alternatively spliced forms of this messenger revealed that agonist stimulation for 8 h was sufficient to strongly reduce the steady-state levels of NR1 mRNA (Fig. 3D); levels of  $\beta$ -actin mRNA were unaffected. Consistent with the protein expression data shown in Fig. 2C, the reduction in NR1 mRNA expression after 24 h of continuous exposure to NMDA (Fig. 3D) was not affected by arrest of NMDA signaling with DL-AP5 added to the medium after a 2-h exposure to NMDA (Fig. 3E). This experiment thus reveals a new mechanism of NMDAR down-regulation in which brief overactivation of the receptor specifically and irreversibly reduces the expression levels of NR1 mRNA.

**Overstimulation with NMDA Decreases Neuronal Expression of NR1 mRNA by the Specific Inhibition of NR1 Transcription**—To better characterize the time course of NR1 mRNA down-regulation during the first hours of NMDA treatment, when neuronal death is low, we determined its expression by RNase protection assay (Fig. 4A) and real time PCR (Fig. 4B). The NR1 probe and the specific oligonucleotides used in these experiments were designed to detect all isoforms of this mRNA.

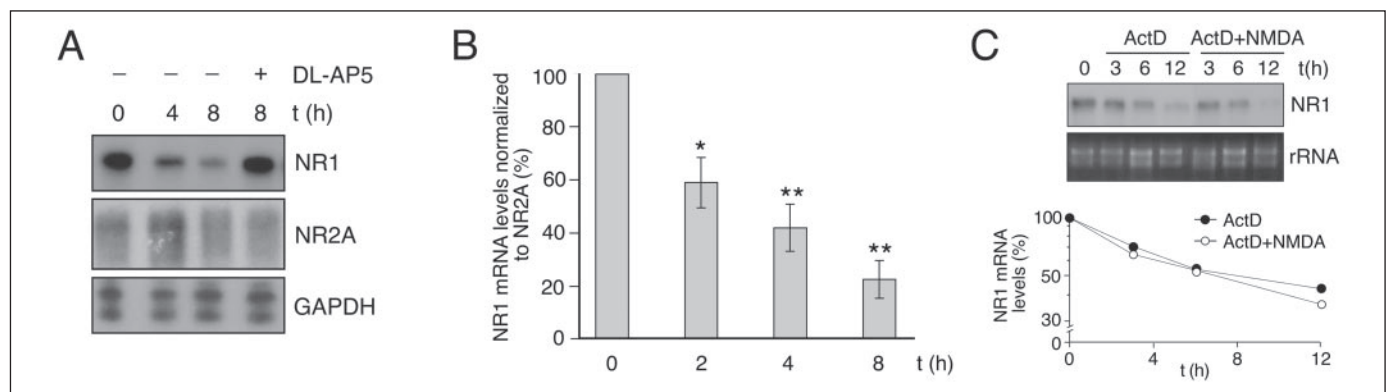
The amount of the NR1 protected fragment was notably decreased by 4 h of treatment and was further reduced by 8 h; DL-AP5 completely prevented this decrease (Fig. 4A, top panel). In contrast, the levels of mRNA for the housekeeping gene GAPDH were not modified by NMDA (Fig. 4A, bottom panel).

Because we detected some neuronal death in response to NMDA stimulation (Fig. 1D), it was important to normalize NR1 mRNA expression to a neuronal mRNA that is not significantly modified by NMDA. We used NR2A for this, because *de novo* synthesis of this subunit was not affected by NMDA treatment (Fig. 3C). This mRNA was expressed at very low levels relative to NR1 but was not modified by NMDA stimulation (Fig. 4A, middle panel). Therefore, for NR1 mRNA quantitation we performed real time PCR of both mRNAs and normalized NR1 mRNA amounts to those of NR2A (Fig. 4B). Exposure to NMDA for 2 h decreased the expression of NR1 mRNA by 41% ( $p < 0.05$ ) and by 58 and 77% after 4 and 8 h, respectively ( $p < 0.01$ ).

A possible reason for the marked down-regulation of NR1 mRNA might be an NMDA-induced increase in the turnover of this mRNA. To test this possibility, we performed RNase protection assays to compare the kinetics of decay of NR1 mRNA in cultures treated for different times with transcriptional inhibitor actinomycin D, alone or together with NMDA (Fig. 4C, top panel). In these experiments, the results were normalized to rRNA because unlike mRNA its expression is not modified by actinomycin D treatment (Fig. 4C, middle panel). The half-life of NR1 mRNA was the same in cells treated with actinomycin D alone or in combination with NMDA (represented in the lower panel of Fig. 4C). This suggests that both compounds are affecting the same step of NR1 regulation and excludes the possibility that NMDA increases the turnover of NR1 mRNA.



**FIGURE 3. Effect of activation of the NMDAR on NR1 mRNA and protein synthesis.** *A*, primary cultures of neurons were incubated with NMDA/glycine for 8 h as indicated, and NR1 was detected by immunoblot (*IB*). The NR1 antibody only recognizes the full-length protein, and no proteolytic fragments could be detected, even after film overexposure. *B*, neurons were preincubated for 2 h with 10  $\mu$ M Ci111 before a 12-h treatment with NMDA/glycine. Ci111 remained in the culture medium for the duration of the experiment. Immunoblots were performed as before for NR1 and  $\beta$ -actin and also with an antibody to a conserved region in the C terminus of subunits NR2A and B. *C*, analysis of *de novo* synthesis of receptor subunits in neurons treated with NMDA. Neuronal cultures were stimulated with NMDA/glycine and, after 3 h, were labeled during a further 4 h with [ $^{35}$ S]methionine + cysteine (150  $\mu$ Ci/ml). Untreated cells were used for the control. Protein extracts were immunoprecipitated with antibodies specific for the NR1 subunit, the NR2A/B subunits (C-ter), or calnexin (CNX). Autoradiography of the immunoprecipitated proteins is shown. *D*, Northern blot analysis of NR1 mRNA. Total RNA was prepared from cells treated with NMDA/glycine for the indicated times and from time-paired untreated cells. The DNA probe used corresponds to 936 nucleotides spanning exons 1–7 of NR1 isoform 1a and therefore is able to hybridize all the alternatively spliced forms of this messenger. We detected  $\beta$ -actin mRNA as a control. *E*, Northern blot analysis of NR1 mRNA from neurons treated with NMDA/glycine for 2 h before the addition of DL-AP5 (200  $\mu$ M) and incubation up to 24 h.



**FIGURE 4. Time course and specificity of the down-regulation of NR1 mRNA.** *A*, time course of NR1 mRNA decay. Total RNA was extracted from cultured neurons treated with NMDA/glycine for 4 and 8 h and from untreated controls. In another control, the cells were stimulated for 8 h with NMDA/glycine in the presence of DL-AP5. RNase protection assay was performed on 20  $\mu$ g of total RNA with RNA probes for NR1, NR2A, and GAPDH. *B*, quantitation of the decay of NR1 mRNA. Levels of NR1 mRNA measured by quantitative real time PCR were normalized to those of NR2A in the same samples. The values are expressed as the percentage of those found in untreated cells. The data shown are the means  $\pm$  S.D. of three independent experiments, and statistical significance was evaluated by Student's unpaired *t* test. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ . *C*, time course of NR1 mRNA decay in cells treated with actinomycin D (ActD) alone or in combination with NMDA. The cells were pretreated with ActD (2.5  $\mu$ g/ml) for 1 h, and where indicated NMDA/glycine was added. The times refer to the length of incubation with NMDA/glycine. ActD was present for the duration of the experiment. RNase protection assay was performed as before, and rRNA was used as a loading control. The plots show the quantitation of NR1 mRNA in neurons treated with ActD alone (filled circles) and ActD plus NMDA/glycine (open circles). NR1 mRNA amounts were normalized to the rRNA present in the same samples, and the values are expressed as percentages of those in untreated cells.

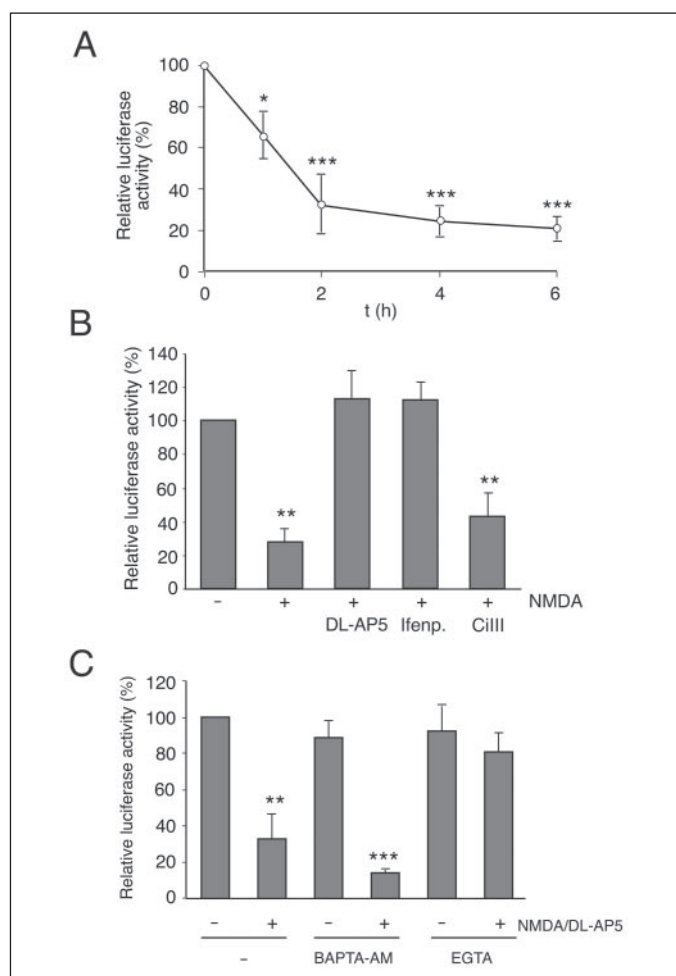
We examined the effect of NMDA on NR1 transcription in gene promoter/reporter assays (Fig. 5). Cortical neurons were transiently transfected with pNRL5.4 (19), a plasmid containing 5.4 kb of the NR1 promoter coupled to the firefly luciferase gene. For normalization, the cells were co-transfected with pRL-SV40 plasmid, which constitutively expresses *Renilla* luciferase and was not modified by NMDA stimulation (data not shown).

Transfected neurons were treated with NMDA for different times, and luciferase activities were measured in the cell lysates (Fig. 5A). The activity of the NR1 promoter was reduced by 34% relative to unstimulated cells after treatment for 1 h ( $p < 0.05$ ) and by 68% ( $p < 0.001$ ) after 2 h. NMDA treatment for 6 h decreased NR1 promoter activity by 79% ( $p < 0.001$ ), and this was completely prevented by DL-AP5 and by ifenprodil, demonstrating that NR2B sub-

units are required (Fig. 5B). In contrast, a reduction in promoter activity of 57% ( $p < 0.01$ ) was still observed in neurons pretreated with Ci111, indicating that the activity of calpain is not required for the inhibition of NR1 promoter activity.

In accordance with the protein expression data shown in Fig. 2C, brief exposure to high concentrations of NMDA was sufficient to irreversibly inhibit the NR1 promoter activity measured at later times (Fig. 5C). For this experiment we used pNRL356, a plasmid containing only 356 bp of the NR1 promoter coupled to the firefly luciferase gene (29). When transfected neurons were stimulated with NMDA for 1 h, followed by protection with DL-AP5, the luciferase activity measured 24 h later was reduced by 67%.

Using this same experimental procedure, we demonstrated that NMDA-induced down-regulation of NR1 transcription was triggered



**FIGURE 5. NR1 promoter activity in neurons treated with NMDA.** A, neurons were transiently co-transfected with the reporter plasmid pNRL5.4, which contains the NR1 promoter coupled to the firefly luciferase gene, together with pRL-SV40, which constitutively expresses *Renilla* luciferase. Forty hours after transfection, the cells were treated with NMDA/glycine for the indicated times. The firefly luciferase activity was normalized to *Renilla* values obtained in the same samples. Relative luciferase activity is expressed as a percentage of that in untreated cells. The data shown are the means  $\pm$  S.D. of three independent experiments, and the statistical significance of differences between treated and untreated cells was evaluated by Student's unpaired *t* test. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . B, neuronal cultures transiently transfected as before were stimulated for 6 h with NMDA/glycine alone or together with the antagonists DL-AP5 (200  $\mu$ M) or ifenprodil (ifenp, 10  $\mu$ M) as indicated. Some cells were pretreated with Ci111 (10  $\mu$ M) for 2 h before stimulation with NMDA/glycine. Luciferase activity was normalized and expressed as before. \*\*,  $p < 0.01$ . C, neuronal cultures were transiently transfected with pNRL356, which contains the proximal 356 base pairs of the NR1 promoter coupled to firefly luciferase and with pRL-SV40. Forty hours later, the cells were pretreated with BAPTA-AM (40  $\mu$ M) or EGTA (2 mM) for 2 h before treatment with NMDA/glycine for 1 h, still in the presence of the calcium chelators. The cells were then washed and fed with conditioned medium plus DL-AP5 (200  $\mu$ M). Expression of luciferase was determined 24 h later. The results were normalized and expressed as before. \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

by  $\text{Ca}^{2+}$  influx via the NMDAR (Fig. 5C). Chelation of extracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  by preincubation for 2 h with EGTA (2 mM) completely prevented the decrease in NR1 promoter activity induced by NMDA treatment. In contrast, loading cells with the intracellular calcium chelator BAPTA-AM (40  $\mu$ M) had no effect. Probably, the capacity of BAPTA-AM is insufficient to chelate a local or post-synaptic increase in  $\text{Ca}^{2+}$  such as that produced by NMDAR overactivation. These results thus demonstrate that an influx of calcium ions triggered by brief overstimulation of NMDARs containing NR2B subunits leads to the specific transcriptional inhibition of the NR1 gene.

**NR1 Expression Is Down-regulated in an Animal Model of Cerebral Ischemia**—Excitotoxicity induced by overactivation of NMDARs is responsible for the neuronal degeneration observed in diverse patholo-

gies, including cerebral ischemia (2). Considering the results we obtained *in vitro* in the cortical neuron model of excitotoxicity, we sought to establish whether a similar process occurs *in vivo* in an animal model of cerebral ischemia. We characterized the expression of the NR1 subunit in the cortices of rats subjected to transient focal cerebral ischemia induced by 1 h of occlusion of the middle cerebral artery (MCAO) followed by reperfusion from 0 to 48 h. This is a highly reliable model in which the characteristic changes of ischemic necrosis are limited to the cortex and the subcortical structures and basal ganglia are spared (30). Large infarcts are reproducibly produced in the right middle cerebral artery territory after 24 h of reperfusion, as shown in Fig. 6A (upper panel), where cortical tissue poorly stained by Nissl is clearly visible in coronal sections of the brain.

Expression of NR1 was first determined by immunohistochemistry of contiguous sections, and the specific staining was compared between equivalent areas of the infarcted region and the contralateral hemisphere (Fig. 6A, panels a and b). As expected, we observed numerous NR1-positive neurons in the neocortex of the contralateral area, with immunoreactivity mainly associated with the cell soma and the dendrites (Fig. 6A, panel b). In marked contrast, NR1 immunoreactivity was significantly reduced in the infarcted tissue (Fig. 6A, panel a).

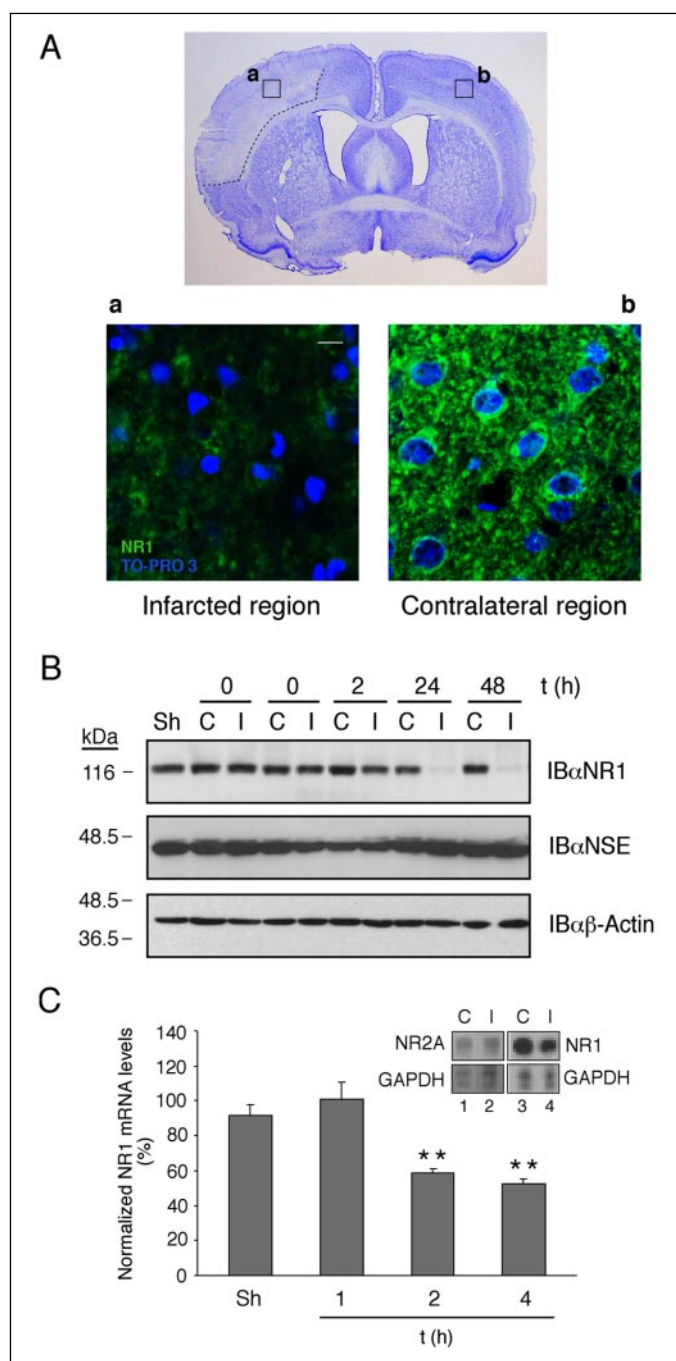
To better characterize the time course and specificity of NR1 down-regulation in the animal model, NR1 protein expression in the infarcted area was compared with that in the corresponding region of the contralateral hemisphere and in sham-operated animals (Fig. 6B, top panel). The amount of NR1 protein detected in the infarcted region decreased progressively with the time of reperfusion; the levels were moderately decreased after 2 h and were almost undetectable after 24 h. NR1 expression was unchanged in brain extracts from animals sacrificed immediately after the occlusion period or from sham-operated rats. Immunoblot analysis of NSE and  $\beta$ -actin (Fig. 6B, middle and bottom panels, respectively) demonstrated that down-regulation of NR1 is not a general effect of the ischemic process.

We next used RNase protection assay to investigate whether the decay in NR1 was due to a decrease in the levels of its coding mRNA in the infarcted area (Fig. 6C). Total RNA was prepared from the ischemic region and from the corresponding area of the contralateral hemisphere of animals subjected to MCAO and reperfusion for 1, 2, or 4 h. NR1 mRNA expression in the ipsilateral hemisphere, normalized to GAPDH, was expressed as the percentage of that detected in the contralateral one; for sham-operated animals, the right and left hemispheres were compared. Levels of NR1 mRNA in the ipsilateral hemispheres of animals subjected to 2 h of reperfusion were reduced by 41% ( $p < 0.01$ ), whereas the reduction was 47% by 4 h ( $p < 0.01$ ). The variation in NR1 mRNA expression between the brain hemispheres of sham operated animals, or of operated animals reperfusion for only 1 h, was not statistically significant. The decrease is specific for NR1 and was not observed for NR2A mRNA (Fig. 6C, inset), in agreement with the post-translational mechanism of down-regulation previously proposed for NR2A/B in transient forebrain ischemia (25). In conclusion, our experiments show that cerebral ischemia results in the negative regulation of NR1 mRNA at early reperfusion times, with consequent down-regulation of this obligatory NMDAR subunit.

## DISCUSSION

We have identified a new mechanism of down-regulation of the NMDAR in neurons, schematically represented in Fig. 7, which is induced by excessive receptor activation. Because this mechanism affects the expression of NR1, the essential subunit of the NMDAR, it will have a great impact on the functionality of all NMDAR variants. Excessive activation of the NMDAR by co-agonists NMDA and glycine (Fig. 2A) induces the spe-





**FIGURE 6. Down-regulation of NR1 mRNA and protein in transient brain ischemia.** *A*, coronal section of a rat brain from an animal subjected to 1 h of MCAO treatment followed by 24 h of blood reperfusion. Nissl staining revealed an area of infarcted tissue in the neocortex of the right hemisphere, highlighted by the dashed line. Immunohistochemistry of adjacent sections was performed to detect expression of NR1 (green). Representative results of those obtained in the infarcted region (box *a*) and the corresponding area of the contralateral hemisphere (box *b*) are shown. TO-PRO 3 was used to stain the cell nuclei (blue). Confocal microscopy images correspond to a single section, and the scale bars represent 10  $\mu$ m. *B*, Protein extracts were prepared from the infarcted region of the cortex (*I*) and the corresponding area in the contralateral hemisphere (*C*) of rats subjected to MCAO followed by reperfusion for the indicated times. Control extracts were obtained from the brains of sham-operated animals (*Sh*). Equal amounts of protein (50  $\mu$ g) were analyzed by immunoblot with antibodies for NR1, NSE, and  $\beta$ -actin. *C*, RNase protection assay was performed as before on total RNA (15  $\mu$ g) from the cortices of rats subjected to MCAO followed by reperfusion for 1, 2, or 4 h. Amounts of NR1 mRNA were normalized to the amount of GAPDH mRNA in the same sample. The results obtained for the infarcted region were then compared with values found in the corresponding area of the contralateral hemisphere, assigned a value of 100%. We also compared the right and left hemispheres of sham-operated animals. The data show the means  $\pm$  S.E. of the amount of NR1 mRNA remaining in each animal group ( $n = 3$ ). Statistical significance of the difference between the contralateral and ipsilateral hemi-

cific and rapid transcriptional inhibition of the NR1 promoter (Fig. 5*A*) in a process strictly dependent on  $\text{Ca}^{2+}$  influx via this receptor (Fig. 5*C*). Inhibition of NR1 transcription results in a progressive decrease in NR1 mRNA (Fig. 4*B*) and protein (Fig. 1*D*). The decay profile of NR1 that we observe is compatible with the biphasic pattern previously described for this protein. This pattern results from the existence of two populations of NR1 with half-lives of 2 and 34 h, which respectively correspond to unassembled NR1 and NR1 assembled with NR2 subunits in NMDARs at the cell surface (23). Enhanced endocytosis/degradation is most likely not involved in the down-regulation of NR1 induced by NMDA, because the use of specific inhibitors does not alter the process. Our results also suggest that the agonist does not modify the normal turnover of the NR1 protein already present in the neuron at the time of NMDA overstimulation. The decrease in NR1 mRNA and protein is not caused by neuronal cell death, because the activity of the NR1 promoter is already reduced by 68% 2 h after NMDA stimulation (Fig. 5*A*), at which time the decrease in neuronal viability is lower than 18% (Fig. 1*D*).

The inhibition of *de novo* NR1 synthesis induced by NMDA will probably lead to the retention of newly synthesized NR2 proteins in the endoplasmic reticulum, as occurs in NR1 knock-out mice (35). Whether or not NR2 processing is affected in this way, the result of NMDA overstimulation would be a progressive decrease in NMDAR activity, because the functionality of this receptor is strictly dependent on the expression of NR1/NR2 hetero-oligomers at the cell surface (4).

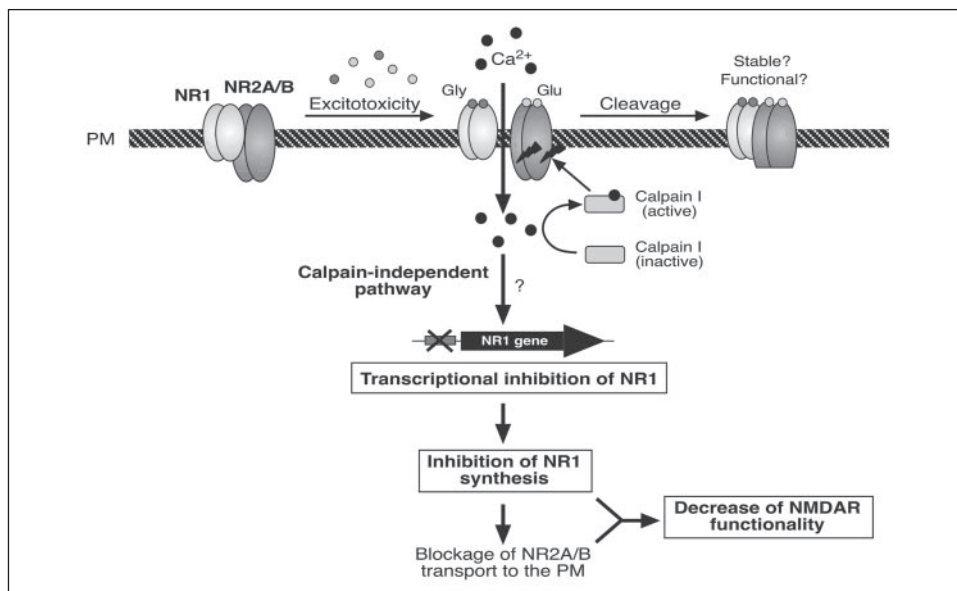
Fig. 7 also highlights the fact that the mechanism of NR1 regulation is different from the one previously characterized for NR2A/B (25). Neuronal calpain, activated very early by calcium entry through the NMDAR (36), efficiently cleaves NR2A/B, producing an N-terminal fragment of unknown function that likely remains in the cell membrane (25). This is in marked contrast to the down-regulation of NR1, where calpain activity is not required for the inhibition of NR1 transcription (Fig. 5*B*) or for the decrease in the steady-state levels of NR1 protein (Fig. 3*B*). Calpain-dependent down-regulation of NR2A/B might represent a second negative feedback mechanism to down-regulate NMDAR function; calpain inhibitors have been reported to prevent a significant reduction in whole cell NMDAR-mediated currents in acutely isolated or cultured cortical neurons treated with NMDA or glutamate (27).

Down-regulation of NR1 expression specifically requires activation of NMDARs containing NR2B subunits (Figs. 2*A* and 5*B*) and is therefore associated with signaling pathways coupled to NR1/NR2B or NR1/NR2A/NR2B receptors. Because brief receptor stimulation is sufficient to irreversibly reduce levels of NR1 (Fig. 2*C*), rapid fragmentation of NR2B subunits by calpain would not interfere with NR1 down-regulation. Nor is fragmentation of NR2B required for NR1 down-regulation, which was not prevented by calpain inhibition (Figs. 3*B* and 5*B*).

NR2B is expressed in hippocampal and cortical neurons early in development, when NMDARs are mostly nonsynaptic (14, 37). NR2A appears later (5) and is mainly incorporated into synapses of mature neurons, whereas NR2B predominates at extrasynaptic sites (14, 37–39). The localization of the NMDARs affects their biophysical properties (40) and biological responses. The activation of synaptic receptors initiates changes in synaptic efficacy and promotes survival coupled to induction of the activity of CREB and gene expression of brain-derived neurotrophic factor. In contrast, stimulation of extrasynaptic NMDARs activates a general and dominant CREB shut-off pathway that blocks induction of brain-derived neu-

spheres was evaluated by Student's unpaired *t* test. \*\*  $p < 0.01$ . The inset shows a representative result from one animal subjected to 4 h of reperfusion. RNase protection was performed with RNA probes for NR2A and GAPDH mRNAs (lanes 1 and 2) or to NR1 and GAPDH (lanes 3 and 4).

**FIGURE 7. Model of NMDAR regulation in excitotoxicity and ischemia.** Overactivation of NMDARs containing NR2B subunits by the co-agonists glutamate (Glu) and glycine (Gly) leads to  $\text{Ca}^{2+}$  overload in post-synaptic neurons, which results in the specific and rapid inhibition of the transcription of the NR1 gene. The mechanism responsible for transcriptional blockade is still unknown, although we have determined that is not dependent on calpain activation but does require calcium influx. The progressive decrease produced in the steady-state levels of the NR1 subunit has important implications for NMDAR functionality because NR1 is an obligatory subunit of this receptor (3). The inhibition of *de novo* NR1 synthesis will probably have an additional effect on receptor activity, through a possible blockage of transport of the NR2A and NR2B subunits to the plasma membrane (PM) (35). In parallel to these effects, the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protease calpain is activated and efficiently cleaves NR2A/B subunits to produce N-terminal fragments of unknown function that are thought to remain in the PM (25).



retrophic factor expression and is coupled to cell death pathways (11). The shut-off of CREB has been also described in stroke conditions (Ref. 41 and references therein). The requirement of NR2B subunits and of excitotoxic concentrations of agonists for NR1 down-regulation thus suggests a fundamental role of the extrasynaptic NMDARs overactivation in this regulatory process.

Interestingly, three cAMP regulatory elements have been characterized in the rat NR1 promoter, and these have been suggested to be critical for its expression (42). The inhibition of NR1 transcription might therefore be explained by the shut-off of CREB activity produced by NMDA stimulation of extrasynaptic receptors. In support of this hypothesis, the NR2B-specific antagonist ifenprodil, which prevents NR1 transcriptional down-regulation (Fig. 5B), also blocks the decay in CREB phosphorylation mediated by extrasynaptic receptors (11).

Another possible explanation of our results would be the interaction of a repressor element 1 in the NR1 promoter with REST/NRSF (repressor element 1-silencing transcription factor/neuron-restriction silencer factor). This element is a determinant for NR1 up-regulation during neuronal differentiation, a process concomitant with the decrease in levels of REST/NRSF and its interaction with repressor element 1 (19). Interestingly, ischemic insults de-repress expression of this silencing factor in those neurons committed to die, resulting in the suppression of the promoter activity and expression of the GluR2 subunit of the  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) type of glutamate receptor (43). It will be very interesting to establish whether this repressor might be also responsible for the suppression of NR1 transcription found in excitotoxic conditions.

The results obtained *in vivo* with the animal model of transient cerebral ischemia (Fig. 6) suggest that this mechanism of NR1 autoregulation operates similarly in the adult brain. This is not unexpected because excitotoxic activation of NMDARs is a key event in neuronal degeneration and death produced during hypoxia, ischemia, and several neurodegenerative pathologies (2). Transcriptional control plays a role in the pathophysiology of the post-ischemic brain, and there are multiple examples of genes down- and up-regulated in the cortex and striatum of rats subjected to transient focal ischemia (44). The down-regulation of NR1 mRNA, starting 2 h after reperfusion (Fig. 6C), may have an important role in delayed neuronal death, as suggested for GluR2 (43); NR1 subunits are hardly detectable by 24 h of reperfusion (Fig. 6, A and B), and there will therefore be no functional

synaptic receptors available for signaling to survival pathways. However, the possibility that NR1 regulation is part of an adaptive response of neurons to high concentrations of glutamate cannot be excluded.

Recently, in a mouse model of traumatic brain injury, a long lasting loss of NMDAR function has been described following short lived hyperactivation (<1 h) (45). This decrease in functionality might contribute to the cognitive and neurological impairment produced in patients of traumatic or ischemic brain injury and might also explain the failure of clinical trials with NMDAR antagonists (45). Our results, obtained using a different model of brain injury, suggest that the decrease in NMDAR functionality elicited by hyperactivation may be a general response of neurons to damage and would be mediated in part by regulation of NR1 gene expression.

**Acknowledgments**—We thank Dr. Guang Bai for the generous gift of plasmids pNRL5.4 and pNRL356 and Drs. Teresa Iglesias and Margarita Behrens for helpful discussions.

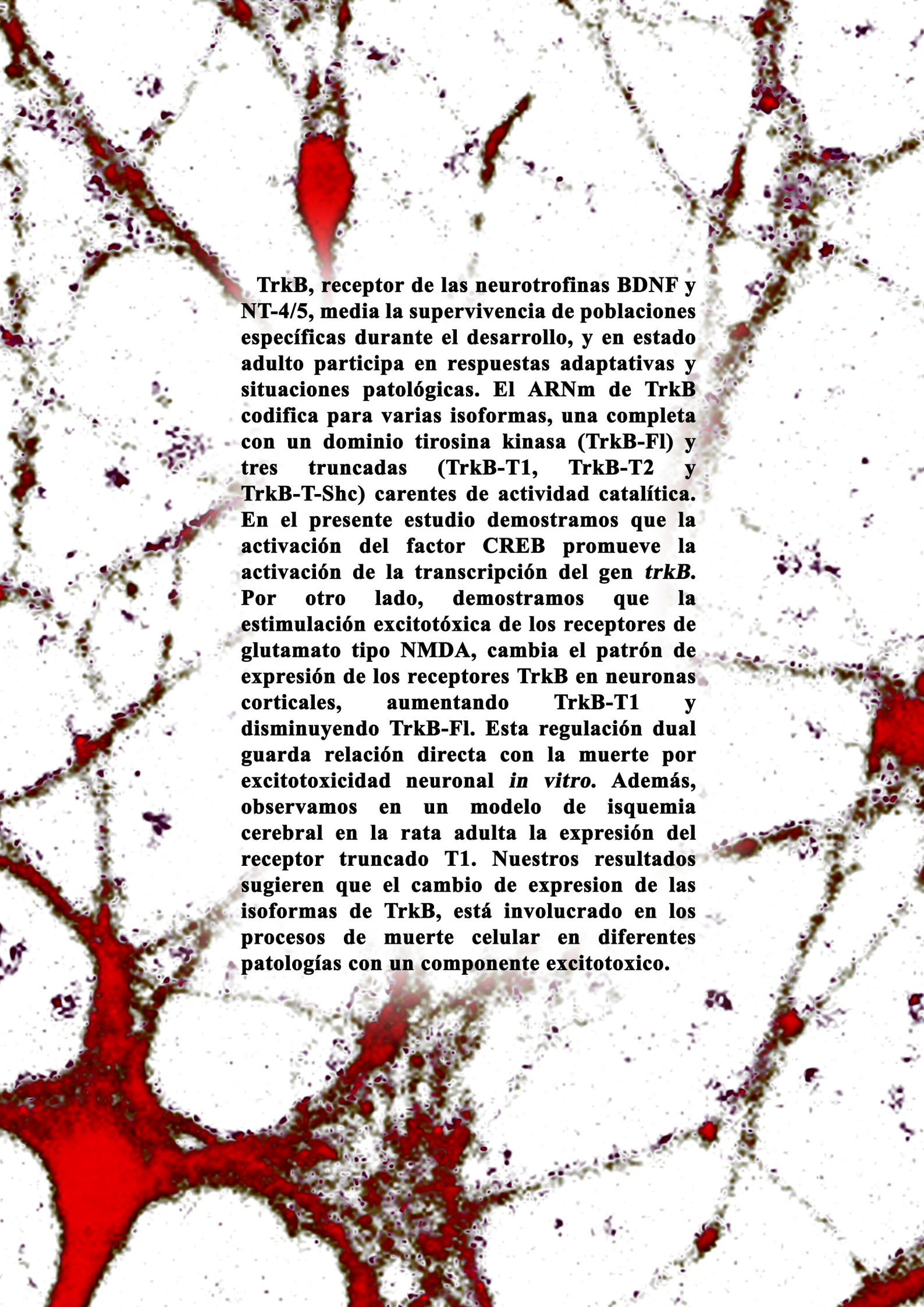
## REFERENCES

- Mori, H., and Mishina, M. (1995) *Neuropharmacology* **34**, 1219–1237
- Choi, D. W. (1988) *Neuron* **1**, 623–634
- Meguro, H., Mori, H., Araki, K., Kushiya, E., Kutsuwada, T., Yamazaki, M., Kumashii, T., Arakawa, M., Sakimura, K., and Mishina, M. (1992) *Nature* **357**, 70–74
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., and Seeburg, P. H. (1992) *Science* **256**, 1217–1221
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B., and Seeburg, P. H. (1994) *Neuron* **12**, 529–540
- Hollmann, M., and Heinemann, S. (1994) *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 31–108
- Westbrook, G. L. (1994) *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**, 337–346
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., and Nakanishi, S. (1991) *Nature* **354**, 31–37
- Ishii, T., Moriyoshi, K., Sugihara, H., Sakurada, K., Kadotani, H., Yokoi, M., Akazawa, C., Shigemoto, R., Mizuno, N., and Masu, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 2836–2843
- Husi, H., Ward, M. A., Choudhary, J. S., Blackstock, W. P., and Grant, S. G. (2000) *Nat. Neurosci.* **3**, 661–669
- Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., and Bading, H. (2002) *Nat. Neurosci.* **5**, 405–414
- Wenthold, R. J., Prybylowski, K., Standley, S., Sans, N., and Petralia, R. S. (2003) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**, 335–358
- Tovar, K. R., and Westbrook, G. L. (2002) *Neuron* **34**, 255–264
- Tovar, K. R., and Westbrook, G. L. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 4180–4188
- Rao, A., and Craig, A. M. (1997) *Neuron* **19**, 801–812
- Prybylowski, K., Fu, Z., Losi, G., Hawkins, L. M., Luo, J., Chang, K., Wenthold, R. J., and Vicini, S. (2002) *J. Neurosci.* **22**, 8902–8910
- Barria, A., and Malinow, R. (2002) *Neuron* **35**, 345–353

18. Buller, A. L., Larson, H. C., Schneider, B. E., Beaton, J. A., Morrisett, R. A., and Monaghan, D. T. (1994) *J. Neurosci.* **14**, 5471–5484
19. Bai, G., Zhuang, Z., Liu, A., Chai, Y., and Hoffman, P. W. (2003) *J. Neurochem.* **86**, 992–1005
20. Awobuluyi, M., Lipton, S. A., and Sucher, N. J. (2003) *J. Neurochem.* **87**, 1066–1075
21. Chazot, P. L., and Stephenson, F. A. (1997) *J. Neurochem.* **68**, 507–516
22. Hall, R. A., and Soderling, T. R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 4135–4140
23. Huh, K. H., and Wenthold, R. J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 151–157
24. Carroll, R. C., and Zukin, R. S. (2002) *Trends Neurosci.* **25**, 571–577
25. Simpkins, K. L., Guttman, R. P., Dong, Y., Chen, Z., Sokol, S., Neumar, R. W., and Lynch, D. R. (2003) *J. Neurosci.* **23**, 11322–11331
26. Dong, Y. N., Waxman, E. A., and Lynch, D. R. (2004) *J. Neurosci.* **24**, 11035–11045
27. Wu, H. Y., Yuen, E. Y., Lu, Y. F., Matsushita, M., Matsui, H., Yan, Z., and Tomizawa, K. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 21588–21593
28. Rose, K., Goldberg, M. P., and Choi, D. W. (1993) *Methods Toxicol.* **1A**, 46–60
29. Bai, G., and Kusiak, J. W. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 7737–7744
30. Chen, S. T., Hsu, C. Y., Hogan, E. L., Maricq, H., and Balentine, J. D. (1986) *Stroke* **17**, 738–743
31. Liu, T. H., Beckman, J. S., Freeman, B. A., Hogan, E. L., and Hsu, C. Y. (1989) *Am. J. Physiol.* **256**, H589–H593
32. Williams, K. (1993) *Mol. Pharmacol.* **44**, 851–859
33. Koh, J. Y., and Choi, D. W. (1988) *J. Neurosci.* **8**, 2153–2163
34. Mu, Y., Otsuka, T., Horton, A. C., Scott, D. B., and Ehlers, M. D. (2003) *Neuron* **40**, 581–594
35. Fukaya, M., Kato, A., Lovett, C., Tonegawa, S., and Watanabe, M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4855–4860
36. Adamec, E., Beermann, M. L., and Nixon, R. A. (1998) *Brain Res. Mol. Brain Res.* **54**, 35–48
37. Li, J. H., Wang, Y. H., Wolfe, B. B., Krueger, K. E., Corsi, L., Stocca, G., and Vicini, S. (1998) *Eur. J. Neurosci.* **10**, 1704–1715
38. Stocca, G., and Vicini, S. (1998) *J. Physiol.* **507**, 13–24
39. Rumbaugh, G., and Vicini, S. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 10603–10610
40. Li, B., Chen, N., Luo, T., Otsu, Y., Murphy, T. H., and Raymond, L. A. (2002) *Nat. Neurosci.* **5**, 833–834
41. Walton, M. R., and Dragunow, I. (2000) *Trends Neurosci.* **23**, 48–53
42. Lau, G. C., Saha, S., Faris, R., and Russek, S. J. (2004) *J. Neurochem.* **88**, 564–575
43. Calderone, A., Jover, T., Noh, K. M., Tanaka, H., Yokota, H., Lin, Y., Grooms, S. Y., Regis, R., Bennett, M. V., and Zukin, R. S. (2003) *J. Neurosci.* **23**, 2112–2121
44. Kim, J. B., Piao, C. S., Lee, K. W., Han, P. L., Ahn, J. I., Lee, Y. S., and Lee, J. K. (2004) *J. Neurochem.* **89**, 1271–1282
45. Biegon, A., Fry, P. A., Paden, C. M., Alexandrovich, A., Tsenter, J., and Shohami, E. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 5117–5122





A microscopic image of neurons, likely from a rat brain, showing cell bodies and branching processes. The neurons are stained with a red dye, possibly DAPI or a similar nuclear stain, which highlights the nuclei and some cytoplasmic structures. The background is a light, grainy texture, typical of a histological section.

**TrkB, receptor de las neurotrofinas BDNF y NT-4/5, media la supervivencia de poblaciones específicas durante el desarrollo, y en estado adulto participa en respuestas adaptativas y situaciones patológicas. El ARNm de TrkB codifica para varias isoformas, una completa con un dominio tirosina kinasa (TrkB-FI) y tres truncadas (TrkB-T1, TrkB-T2 y TrkB-T-Shc) carentes de actividad catalítica. En el presente estudio demostramos que la activación del factor CREB promueve la activación de la transcripción del gen *trkB*. Por otro lado, demostramos que la estimulación excitotóxica de los receptores de glutamato tipo NMDA, cambia el patrón de expresión de los receptores TrkB en neuronas corticales, aumentando TrkB-T1 y disminuyendo TrkB-FI. Esta regulación dual guarda relación directa con la muerte por excitotoxicidad neuronal *in vitro*. Además, observamos en un modelo de isquemia cerebral en la rata adulta la expresión del receptor truncado T1. Nuestros resultados sugieren que el cambio de expresión de las isoformas de TrkB, está involucrado en los procesos de muerte celular en diferentes patologías con un componente excitotóxico.**